



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Alteraciones visuales en un modelo animal de albinismo

TESIS PRESENTADA MEDIANTE PROCEDIMIENTO DE CONFIDENCIALIDAD

LOS TEXTOS; IMÁGENES Y TABLAS PROTEGIDOS HAN SIDO SUPRIMIDOS DE ESTE EJEMPLAR
PARA PODER SER DEPOSITADO PARA SU CONSULTA PÚBLICA

M^a Esther Zurita Redondo

Madrid, 2012



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Tesis Doctoral titulada:

Alteraciones visuales en un modelo animal de albinismo

Presentada por: **M^a Esther Zurita Redondo**

Licenciada en Biología, Universidad de Alcalá de Henares

Para optar al Grado de Doctor

Director de tesis: **Lluís Montoliu José**

Laboratorio “Modelos animales por manipulación genética”

Departamento de Biología Molecular y Celular

Centro Nacional de Biotecnología

Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Campus de Excelencia UAM+CSIC

Madrid, 2012

Esta tesis doctoral ha sido realizada por M^a Esther Zurita Redondo en el Laboratorio “Modelos Animales por Manipulación Genética” del Departamento de Biología Molecular y Celular, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), bajo la supervisión del Dr. Lluís Montoliu José, Investigador Científico del CSIC.

Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral:

- Proyecto en Ciencias de la Salud y Tecnologías, Comunidad Autónoma de Madrid “Identificación de genes asociados al desarrollo normal de la retina de mamíferos”, 2005-2006, referencia GR/SAL/0654/2004. Investigador principal: Lluís Montoliu
- Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional, Programa de Biología Fundamental (Biología Molecular y Celular) “Análisis funcional y estructural de dominios de expresión en el genoma de mamíferos”, 2006-2009, referencia BFU2006-12185. Investigador principal: Lluís Montoliu
- Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional, Programa de Biotecnología “Identificación y validación funcional de aisladores genómicos de vertebrados in vitro e in vivo”, 2010-2012, referencia BIO2009-12697. Investigador principal: Lluís Montoliu
- Proyecto CIBERER-ISCIH “Aplicación de chips de ADN (arrays) a la identificación de nuevos genes y al diagnóstico de enfermedades genéticas: malformaciones congénitas, enfermedades oculares y epilepsias”, 2008-2009, referencia INTRA/07/U704.1. Investigador principal: Lluís Montoliu (coordinador general: Carmen Ayuso, FJD, Madrid)
- Proyecto CIBERER-ISCIH “Clonación de un locus asociado a una deficiencia de fotorreceptores (conos) en la retina central de ratones NMRI. Posible nuevo modelo animal de Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)”, 2009, referencia INTRA/09/756.1. Investigador principal: Lluís Montoliu
- Proyecto CIBERER-ISCIH “Evaluación de la capacidad auditiva durante el envejecimiento y en respuesta al daño inducido por ruido en función de los niveles y del tipo de pigmentación”, 2008-2009, referencia INTRA/08/761.1. Investigador principal: Lluís Montoliu (coordinador general: Isabel Varela-Nieto, IIB-UAM/CSIC, Madrid)
- Proyecto de Biomedicina, Comunidad de Madrid, “Modelos Animales para el estudio de enfermedades de la visión” 2012-2015, referencia S2010/BMD-2439. Investigador principal y coordinador: Lluís Montoliu
- M^a Esther Zurita Redondo: Beca con cargo a proyecto de investigación con empresa (Enero-Junio 2006)
- M^a Esther Zurita Redondo: Beca con cargo a proyecto de investigación con empresa (Enero 2007-Agosto 2008)
- M^a Esther Zurita Redondo: Beca FPU, MICINN, referencia AP2007-01713 (Septiembre 2008-Agosto 2012)

El albinismo es una condición genética que se caracteriza por la hipopigmentación y por una serie de déficit visuales. Los defectos del sistema visual incluyen déficits de fotorreceptores, subdesarrollo de la retina central y conexiones axonales anormales entre la retina y el cerebro. Estos defectos provocan una reducción de la agudeza visual, la pérdida de la visión estereoscópica y una severa pérdida de la visión nocturna y en penumbra. Hasta el momento se han descrito 15 genes diferentes asociados a distintos tipos de albinismo, dependiendo si la hipopigmentación afecta solamente a los ojos (albinismo ocular), si afecta a los ojos, la piel y el pelo (albinismo oculocutáneo) o si está asociado a otros defectos en el organismo. En el laboratorio se han producido varios modelos animales de albinismo oculocutáneo (OCA1), asociados a mutaciones en el gen de la tirosinasa (*Tyr*). Los ratones transgénicos portadores de copias funcionales del gen *Tyr* muestran un fenotipo indistinguible de los ratones silvestres pigmentados, con los déficit visuales característicos del albinismo, corregidos.

El trabajo experimental de esta tesis se inició con el estudio de los patrones de expresión génica diferencial asociados al albinismo, durante el desarrollo de la retina de mamíferos. Se llevó a cabo un abordaje genómico, mediante el uso de *microarrays*, para investigar las variaciones en la expresión de los genes usando ARN de retinas de ratón en dos estadios de desarrollo, 18,5 y 21,5 d.p.c, importantes para la formación de la misma. Se usó la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI para la generación de todos los modelos de ratón transgénicos utilizados como referencia para los distintos estudios. La interpretación bioinformática de los resultados obtenidos y la posterior validación experimental sugirieron que esta colonia de ratones albinos presentaba una variabilidad subyacente que no permitía discriminar variaciones, estadísticamente significativas, en la expresión de los genes.

Mediante estudios electrofisiológicos se detectó una señal eléctrica de conos anormal en algunos individuos de la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI. Esta anomalía de la funcionalidad del sistema visual fue confirmada a nivel estructural por análisis histológicos e inmunohistoquímicos, realizados por microscopía óptica y electrónica. Estas alteraciones de la retina eran similares a las observadas en otras retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad [REDACTED], e independientes de la presencia de los transgenes. Por tanto, estas alteraciones de la retina estaban segregando en la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI. Los déficits de conos se correspondían con los que procesaban la luz a una longitud de onda de 430 nm, los conos azules.

Se decidió clonar el gen, y la mutación asociada, responsable del déficit de los fotorreceptores tipo cono (llamados *coneless*) que estaba segregando en la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI. Se establecieron varios pedigríes de hasta tres generaciones consecutivas y se fenotiparon todos sus individuos. Mediante el uso del panel de MD de Illumina, con 1449 SNPs distribuidos por todo el genoma de ratón. Los resultados del análisis de ligamiento genético indicaron que la mutación seguía un patrón monogénico, autosómico y recesivo, [REDACTED]. Unos 200 genes, con expresión en la retina, fueron encontrados dentro de la región identificada. Algunos de estos genes se analizaron directamente mediante secuenciación de ADN y PCR cuantitativa con resultados negativos. Se decidió utilizar la tecnología de secuenciación masiva; se secuenciaron los exomas de varios ratones representativos de todos los genotipos y tras los respectivos análisis informáticos se [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Summary

Albinism is a congenital condition characterized by hypopigmentation and visual deficits. Defects in the visual system include deficits in photoreceptor cells, underdevelopment of central retina and abnormal axonal connections between the retina and the brain nuclei, resulting in poor visual acuity and severely impaired night and stereoscopic vision. As many as 15 different genes are associated to different types of albinism, depending whether the hypopigmentation affects only the eyes (ocular albinism) or the eyes and the skin/hair (oculocutaneous albinism), and whether the hypopigmentation is associated to other defects in the organism. We have developed several animal models of oculocutaneous albinism (OCA1), associated to mutations in the tyrosinase gene (*Tyr*). Transgenic mice carrying functional copies of *Tyr* displayed a corrected phenotype undistinguishable of pigmented wild-type mice, with corrected visual deficits.

This experimental work aimed initially to study the altered gene expression patterns associated to albinism during mammalian retina development. We decided to use a genomic approach, using gene arrays, to investigate gene expression variation using RNA from mouse retinas at two developmental stages, 18.5 and 21.5 dpc, relevant for retina formation. We used the host albino outbred mouse stock HsdWin:NMRI, used for the generation of all transgenic mouse models, as a reference for our studies. The bioinformatics interpretation of the results obtained and the subsequent experimental validations suggested that the underlying variability present in this mouse stock did not allow the discrimination of statistically significant gene expression variations.

Electroretinography studies detected abnormal cone-derived electrical signals in some individuals of the stock HsdWin:NMRI. This functional abnormality was confirmed at the structural level by histology and immunohistochemistry analyses, both using optic and electron microscopy. These retinal alterations were similar to those observed in retinopathies, including age-related macular degeneration [REDACTED], and the alterations were independent of the presence of transgenes and was segregating among individuals of the stock HsdWin:NMRI. Deficit of cone photoreceptor was confirmed with blue cones, processing 430 nm light.

We decided to clone the gene, and the associated mutation, that was responsible for the photoreceptor cone deficit (named as *coneless*) segregating in the albino outbred stock HsdWin:NMRI. Several pedigrees were established and individuals from three consecutive generations were phenotyped and genotyped using the Illumina MD panel, with 1449 SNPs covering the entire mouse genome. This genetic linkage analysis indicated that this was a monogenic autosomal and recessive trait, [REDACTED]. About 200 genes were found in the identified region with expression in the retina. Some of these genes were directly explored by standard DNA sequencing or q-RT-PCR analyses with negative results. We decided to apply a next generation sequencing (NGS) approach using external services. The entire mouse exomes from representative mouse individuals from all genotypes were analyzed and, after bioinformatic analysis, [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

A mis padres.

A mi hermana.

Agradecimientos

En primer lugar quería dar las gracias a mis padres, por apoyarme siempre y no dejar que desistiera de mis sueños; por enseñarme que con perseverancia, ilusión y humildad se puede conseguir cualquier cosa. Y por supuesto, a mi hermana por escucharme y ayudarme en todo momento, sin importar la hora. ¡Lo hemos conseguido!

A Lluís, mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este interesante proyecto en su laboratorio, gracias.

Igualmente, quisiera dar las gracias a todas aquellas personas ajenas al laboratorio que me ayudaron en este proyecto: a Javier Benítez, Anna González-Neira y Guillermo Pita del CNIO. A Juan Carlos Oliveros del Servicio de Bioinformática del CNB. Y en especial a Pedro de la Villa y Laura Ramírez por todos los análisis electrofisiológicos y por la ayuda con la escritura de la tesis.

A Marta García y al profe Edu por apoyarme desde el primer momento.

A todos mis compañeros del laboratorio 111: Almudena, Cristina, Davide, Diego, María y Marta, gracias por preocuparos tanto por mí y por escucharme, sobretodo en estos últimos meses. Cristina gracias por la ayuda con esos análisis de última hora. A Julia (¡Cuántas charlas de pasillo hemos tenido!), María Jesús y Marta Castrillo. Y finalmente, pero no por ello menos importantes, Sole y Oscar, ¡Qué cortes más bien hechos! ¡¡Gracias por el apoyo, chicos!!

Al servicio de microscopia confocal: a Susana, a Ana Carla y en especial a Sylvia, sin su ayuda todavía estaría pegándome con las inmunos.

A Cristina y Javier del servicio de microscopia electrónica, con vuestra ayuda ha sido todo más fácil.

A Mada, de la secretaría del departamento de Biología Molecular de la UAM, por su paciencia y comprensión.

A mis amigos, que han sabido comprender mis largas ausencias, Cristina, Silvia, Lorenzo, gracias. A Irene, mi compi y amiga de fatigas de la Uni y a Esther mi amiga de “ilusiones marinas” (¡¡Cómo lo pasábamos en los cursos de cetáceos!!). ¡Sois los mejores!

“Rechacemos la tristeza madre de la inacción, preocupémonos de la vida, que es energía, renovación y progreso.

*Y continuemos trabajando, **el entusiasmo y la perseverancia hacen milagros**”.*

Santiago Ramón y Cajal - Premio Nobel de Medicina 1906

Abreviaturas

aARN	ARN transcrito in vitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosin monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ATP	Adenosin trifosfato
BHR	Barrera hematorretiniana
BSA	Albúmina sérica bovina
CG	Capa de células ganglionares
CHS	Síndrome de Chediak-Higashi
CNGA3	Cyclic nucleotide gated channel a-3
CNGB3	Cyclic nucleotide gated channel b-3
CPE	Capa plexiforme externa
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico
CREB	Factor de transcripción de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
CS	Colículo superior
d.p.c	Día postcoital
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHICA	Ácido carboxi-5,6-dihidroxi-indol
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
dNTPs	Deoxinucleótido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERG	Electrorretinograma
ET-1	Endotelina-1
F	Capa fotorreceptores
F0, F1...	Generaciones filiales
FCS	Suero fetal bovino
FGF	Factores de crecimiento
FLC	Fosfolipasa C
FNO	Capa de fibras del nervio óptico
Glut	Glutamato
GMP	Guanosin monofosfato
GNAT2	Guanine nucleotide binding protein
GPR143	G-protein coupled receptor 143
GS	Síndrome de Griscelli
GTP	Guanosin trifosfato
HEPES	Etanosulfonato de hidroxietil piperidina
HPS	Síndrome de Hermansky-Pudlak
IQ	Indol-5,6-quinona
IQCA	Ácido indol-5,6-quinona carboxílico
ISCEV	<i>Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
LCR	Región controladora del locus
L-DOPA	Levo 3,4-dihidroxifenilalanina

Abreviaturas

Lhx2	Gen codifica para la proteína LIM/Homeobox
LYST	Regulador transcripcional de lisosomas
MAPk	Proteína quinasa activadoras de mitosis
Mb	Megapares de bases
MC1R	Receptor de la melanocortina 1
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmía
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
Mlph	Melanofilina
<i>MYO5A</i>	Gen que codifica para la proteína miosina VA
MyoVA	Miosina VA
NE	Capa nuclear externa
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NI	Capa nuclear interna
OA1	Albinismo ocular de tipo 1
OCA	Albinismo oculocutáneo
opsina L	Opsina de longitud de onda larga
opsina M	Opsina de longitud de onda media
opsina S	Opsina de longitud de onda corta
Otx2	Orthodenticle homeobox 2
PAX3	Factor de transcripción <i>Paired box</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponadora con fosfato
PBT	Solución salina tamponadora con fosfato y con Igepal-CA630
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pde6b^{rd1}</i>	Mutación rd1 del gen Pde6b
PDE6C	Fosfodiesterasa 6C
PE	Capa plexiforme externa
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentado
PG	Prostaglandinas
PI	Capa plexiforme interna
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
Pmel17	Proteína de melanocito Pmel 17
POMC	Preopiomelanocortina
Rab27a	Ras-related protein Rab-27A
RDH	Retinol deshidrogenasa
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rx	Factor de transcripción retinal
SE	Segmento externo
SEB	Segmento externo de los bastones
SEC	Segmento externo de los conos
SEF	Segmentos externos de los fotorreceptores
SI	Segmento interno

Abreviaturas

Six3	Proteína <i>homeobox</i> SIX3
SLC45A2	<i>Solute carrier family 45 member 2</i>
SNPs	Polimorfismo de un nucleótido
Sox2	Factor de transcripción SHY (<i>sex determining region Y</i>)-box 2
SSLPs	Single Sequence Length Polimorfism
TAE	Tampón formado por Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solución de 10mM Tris-HCl pH 7.5 y 1mM EDTA
TS	Terminal sináptico
TYR	Gen de la <i>tirosinasa</i> humano
TYRP1	Gen de la <i>tirosinasa</i> relacionada a la proteína de tipo 1
<i>Tyrp1^b</i>	Mutación b del gen Tyrp1
UV	Radiación ultravioleta
Vsx2	Proteína del sistema visual <i>homeobox 2</i>
WS	Síndrome de Waardenburg
α -MSH	Hormona estimulante de melanocitos

INTRODUCCIÓN	1
1. ALBINISMO	3
1.1. Tipos de albinismo	4
1.2. Anomalías visuales asociadas al albinismo	8
1.3. Anomalías auditivas asociadas al albinismo	9
2. MELANINA	9
2.1. Células melanogénicas	9
2.2. Melanogénesis	10
2.2.1. Tirosinasa	11
2.2.2. Biosíntesis de melanina	13
3. SISTEMA VISUAL	15
3.1. Origen embrionario	15
3.2. Anatomía del sistema visual	17
3.3. Estructura general de la retina	18
3.4. Tipos celulares de la retina	20
3.4.1. Epitelio pigmentado de la retina	20
3.4.2. Fotorreceptores	22
3.4.3. Células bipolares	28
3.4.4. Células horizontales	29
3.5. Fototransducción	29
3.6. Estudios no invasivos de la función visual	32
3.6.1. Electrorretinograma	32
3.6.2. Test optomotor	35
<div></div> <div></div>	
4. MODELOS ANIMALES DE ALBINISMO	38
OBJETIVOS	43

MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. MANTENIMIENTO COLONIAS DE RATONES	47
1.1. Animalario	47
1.2. Establecimiento de los cruces experimentales	47
1.3. Genotipado	48
1.3.1. Extracción ADN	48
1.3.2. Cuantificación ADN	48
1.3.3. PCR	49
1.3.4. Electroforesis de ADN	49
1.3.5. SLOT BLOT	49
2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN VISUAL DE LOS RATONES	51
2.1. Electrorretinograma de campo completo	51
2.2. Test optomotor	53
3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE LA ULTRAESTRUCTURA	54
3.1. Obtención y fijación del material biológico	54
3.1.1. Ojos de ratón adulto	54
3.1.2. Cabezas de embriones de ratón	55
3.2. Histología	55
3.2.1. Procesamiento para montaje en historesina	55
3.2.2. Tinción con Cresil Violeta	56
3.3. Inmunohistoquímica	56
3.3.1. <i>Whole mount</i> (neurorretinas enteras)	56
3.3.1.1. Tinción de los conos de las neurorretinas con lectina	57
3.3.1.2. Marcaje específico de fotorreceptores: conos verdes y azules	57
3.3.2. Secciones horizontales de retinas en desarrollo y adultas	58
3.3.2.1. Procesamiento de las cabezas de los embriones	59
3.3.2.2. Procesamiento de los ojos de ratones adultos	60
3.4. Microscopía electrónica	60
3.4.1. Inclusión en resina	61
3.4.2. Ultramicrotomía	61
3.4.3. Tinción	62
3.5. Toma y procesamiento de imágenes de microscopía	62

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA RETINA DE RATONES NMRI, TYRTH E YRT ₂ CON LA TECNOLOGÍA DE <i>MICROARRAYS</i> DE AFFYMETRIX	63
4.1. Extracción de ARN	63
4.2. Cuantificación y análisis de calidad del ARN	63
4.3. Hibridación con <i>microarrays</i>	64
4.4. Análisis de los datos de expresión	64
4.5. PCR cuantitativa con <i>SYBRGREEN</i>	66
4.5.1. Retrotranscripción	66
4.5.2. Diseño de los cebadores de los genes candidatos	66
4.5.3. Obtención de productos de PCR de ADN copia de los genes candidatos	67
4.5.4. Conversión de los datos de la concentración de ADN copia de cada uno de los genes candidatos en número de moléculas/ μ l	68
4.5.5. Diluciones seriadas de cada producto de PCR	68
4.5.6. Optimización de las diluciones de los cebadores	68
4.5.7. Optimización de las diluciones de los productos de PCR	69
4.5.8. Optimización de la concentración del ADN copia	69
4.5.9. PCR cuantitativa de los genes candidatos	69
4.5.10. Análisis estadísticos de los resultados	70
5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS CON LA PLATAFORMA ILLUMINA GOLDENGATE	71
5.1. Análisis de ligamiento genético	72
5.2. Secuenciación de la zona codificante	72
5.3. PCR cuantitativa con sondas Taqman (método $2^{\Delta\Delta CT}$)	72
6. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES DE LA REGIÓN DELIMITADA POR EL ANÁLISIS DE LIGAMIENTO	74
7. SECUENCIACIÓN DE EXOMAS DE RATÓN CON PLATAFORMA AGILENT	74


RESULTADOS	77
1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RETINA DE VARIOS MODELOS ANIMALES DE ALBINISMO	79
1.1. Análisis de expresión con <i>microarrays</i>	80
1.1.1. Cruces	80
1.1.2. Combinación de muestras de ARN	81
1.1.3. Hibridación con <i>microarrays</i> de Affymetrix	82
1.1.4. Análisis informático	82
1.2. Validación de los genes candidatos por PCR a tiempo real	91
1.3. Validación de los genes candidatos por Inmunohistoquímica	94
2. ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIOS MODELOS DE ALBINISMO	104
2.1. Cuantificación del número de conos en retinas de ratones NMRI y Tyr TH	104
2.2. Análisis electrofisiológico de ratones NMRI, YRT ² y Tyr TH	107
2.3. Cuantificación del número de conos en retinas de la colonia no consanguínea HsdWin:NMRI	108
2.4. Análisis de la ultraestructura de la retina de ratones NMRI, Tyr TH e YRT ²	112
3. CARACTERIZACIÓN DE UN LOCUS ASOCIADO A UNA RETINOPATÍA EN LOS RATONES HsdWin:NMRI	116
3.1. Análisis electrorretinográfico	116
3.2. Diseño y análisis de las familias	116
3.3. Estudio estructural de las retinas	117
3.3.1. Histológico	117
3.3.2. Inmunohistológico: tipos de conos	119
3.3.3. Ultraestructura	122
3.3.4. Inmunohistológico: sinápsis en la capa plexiforme externa	127
3.4. Estudio de los polimorfismos asociados al fenotipo <i>coneless</i>	130
3.4.1. Método del mejor gen candidato: <i>Pten</i>	130
3.4.1.1. Análisis de la secuencia de ADN que codifica para el gen <i>Pten</i>	131
3.4.2. Método por aproximación génica	137
3.4.2.1. Análisis de ligamiento genético	137
3.4.2.1.1. Análisis de la secuencia codificante	142
3.4.2.1.2. PCR cuantitativa	144

3.4.2.2. Estudio de microsatélites	144
3.5. Secuenciación de los exomas	146
DISCUSIÓN	151
1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE RATONES ALBINOS Y PIGMENTADOS	153
2. ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIOS MODELOS DE ALBINISMO	159
3. CARACTERIZACIÓN DE UN LOCUS ASOCIADO A UNA RETINOPATÍA EN LOS RATONES HsdWin:NMRI	162
3.1. Análisis de ligamiento genético	162
3.2. Estudio de microsatélites	165
3.3. Secuenciación de los exomas	165
4. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LAS RETINAS NORMALES Y <i>CONELESS</i>	168
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	174

FIGURAS

Figura 1. Personas con distintos tipos de albinismo.	3
Figura 2. Correlación entre las proteínas melanosomales y los tipos de OCA y el OA1.	6
Figura 3. Origen embrionario de los tipos celulares que sintetizan melanina.	10
Figura 4. Esquema de las rutas que regulan la expresión del gen <i>TYR</i> .	12
Figura 5. Procesamiento y degradación de la tirosinasa (TYR).	13
Figura 6. Ruta de biosíntesis de melanina en el melanocito.	14
Figura 7. Desarrollo embrionario de un ojo de ratón.	16
Figura 8. Estructura general del sistema visual humano.	17
Figura 9. Estructura general de la retina.	19
Figura 10. Morfología y distribución de los bastones y de los conos.	22
Figura 11. Micrografías de los TS de la retina de un ratón HsdWin:NMRI.	24
Figura 12. Micrografías de la retina de un ratón transgénico YRT2.	25
Figura 13. Espectros de absorción de los fotopigmentos.	26
Figura 14. Canales cromáticos de procesamiento de los colores.	27
Figura 15. Mecanismo de transmisión de la señal durante la fototransducción.	29
Figura 16. Mecanismo de fototransducción en vertebrados.	30
Figura 17. Hiperpolarización de los fotorreceptores durante la fototransducción.	31
Figura 18. Ciclo retinoide en conos (izquierda) y en bastones (derecha).	32
Figura 19. Respuestas electrorretinográficas estándar en un ratón con visión normal.	34
Figura 20. Instrumental necesario para medir la función visual mediante el test optomotor.	35
Figura 21. Representación esquemática de los transgenes o loci presentes en los modelos animales utilizados.	39
Figura 22. SLOT BLOT, MINIFOLD II.	50
Figura 23. Elementos del equipo de Electrorretinografía.	52

Índice de Figuras y Tablas

Figura 24. Esquema del procesamiento de neurorretinas enteras.	56
Figura 25. Procesamiento de las retinas para MET.	62
Figura 26. <i>Biochips</i> de Affymetrix.	64
Figura 27. Diagrama explicativo de las distintas aplicaciones de GEPAS .	65
Figura 28. Distribución de las muestras, en una placa de 96 pocillos, para el análisis por PCR cuantitativa de cada gen problema.	70
Figura 29. Illumina Goldengate, Mapa del panel de ligamiento genético.	71
Figura 30. Representación esquematizada del proceso de secuenciación masiva (NGS) para la obtención de exomas de ratón.	75
	76
Figura 32. Representación temporal del desarrollo de los distintos tipos celulares de la retina de ratón.	79
Figura 33. Crías de 21,5 d.p.c. Cría NMRI sin pigmento y cría YRT2 con pigmento en ojos y piel.	80
Figura 34. Exposición membranas de hibridación para la detección del transgén TyrTH mediante SLOT-BLOT.	81
Figura 35. Gráficos de comparación de intensidades de fluorescencia de cada gen entre dos modelos animales.	83
Figura 36. Gráficos de normalización. GEPAS v3.1 .	84
Figura 37. Gráfico de expresión diferencial T-Rex tomando como clases el modelo de ratón y el estadio de desarrollo.	85
Figura 38. Gráfico de expresión diferencial T-Rex tomando como clases sólo los modelos animales.	86
Figura 39. Gráfico de expresión diferencial T-Rex tomando como clases los estadios de desarrollo.	87
Figura 40. Anotaciones proceso biológico (Genecodis).	88

Índice de Figuras y Tablas

Figura 41. Gráfico de expresión diferencial T-Rex , sin el grupo 13 tomando como clases sólo los modelos animales.	89
Figura 42. Gráfico FatiScan de GEPAS .	90
Figura 43. Representación resultados PCR cuantitativa.	91
Figura 44. Resultados PCR cuantitativa.	92
Figura 45. Inmunohistoquímica de Spock2.	95
Figura 46. Inmunohistoquímica de Rph3A.	96
Figura 47. Inmunohistoquímica de Fxyd2.	97
Figura 48. Inmunohistoquímica de Pten.	98
Figura 49. Inmunohistoquímica de Mkk6.	99
Figura 50. Inmunohistoquímica de Bassoon.	100
Figura 51. Inmunohistoquímica de Bmf.	101
Figura 52. Inmunohistoquímica de Slc9a9.	102
Figura 53. Inmunohistoquímica de Ntrk2.	103
Figura 54. Estudios de los fotorreceptores tipo cono.	104
Figura 55. Preparaciones histológicas de retina de un ratón NMRI.	105
Figura 56. Preparaciones histológicas de retina de un ratón TyrTH.	105
Figura 57. Gráficos de la recta de regresión.	107
Figura 58. Resultados de los electrorretinogramas: ratones 6237 y 6137	108
Figura 59. Resultados de los electrorretinogramas: ratones 6244 y 6132	109
Figura 60. Preparaciones inmunohistoquímicas de retinas enteras con marcaje de conos con lectina.	110
Figura 61. Gráfico de la media del número de conos de las retinas de los ratones 6132, 6137, 6244 y 6237.	110
Figura 62. Gráficos de distintos contajes de conos.	111
Figura 63. Análisis de la función visual	112

Índice de Figuras y Tablas

Figura 64. Microfotografías de una retina de un ratón pigmentado YRT2	113
Figura 65. Microfotografías EPR.	114
Figura 66. Pedigríes obtenidos.	117
Figura 67. Cortes horizontales de retina.	118
Figura 68. Inmunohistoquímica: tipos de conos en una retina normal.	120
Figura 69. Inmunohistoquímica: tipos de conos en una retina <i>coneless</i> .	121
Figura 70. Microfotografías EPR.	124
Figura 71. Microfotografías EPR.	125
Figura 72. Microfotografías de la capa plexiforme externa (CPE).	126
Figura 73. Microfotografías de la capa plexiforme externa (CPE).	126
Figura 74. Inmunohistoquímica de las conexiones sinápticas entre células bipolares y fotorreceptores.	128
Figura 75. Inmunohistoquímica de las conexiones sinápticas entre células horizontales y fotorreceptores	129
Figura 76. Inmunohistoquímica de <i>Pten</i> .	130
Figura 77. Representación esquemática de los exones y regiones UTR de <i>Pten</i> .	131
Figura 78-A. Secuencias codificantes del gen <i>Pten</i> .	132
Figura 78-B. Continuación de las secuencias codificantes del gen <i>Pten</i> .	133
Figura 78-C. Continuación de las secuencias codificantes del gen <i>Pten</i> .	134
Figura 78-D. Continuación de las secuencias codificantes del gen <i>Pten</i> .	135
Figura 78-E. Continuación de las secuencias codificantes del gen <i>Pten</i> .	136
Figura 79. Representación del cromosoma 3 de ratón.	137
Figura 80. Gráfico de Genecodis .	138
Figura 81. Gráficos de PCR cuantitativa.	144
Figura 82. Selección de muestras de ADN para los ensayos de microsatélites	145

Figura 83. Geles de agarosa correspondientes a tres de los marcadores SSLPs 145

Figura 84. Visualización del alineamiento de las lecturas de transcriptomas en retina 147



Figura 88. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en transporte intracelular con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. 156

Figura 89. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en sinapsis con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. 157

Figura 90. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en ciclo celular y apoptosis con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. 157

Figura 91. Representación de los gradientes de distribución de los tipos de conos en la retina de los ratones. Código de colores del marcaje inmunohistoquímico utilizado en los ensayos. 168

TABLAS

Tabla I. Clasificación de los tipos de albinismo.	4
Tabla II. Prevalencia de las formas de OCA.	5
Tabla III. Intensidades lumínicas para cada tipo de registro electrorretinográfico.	53
Tabla VI. Diluciones de los cebadores para determinar la concentración óptima.	69
Tabla VII. Sondas Taqman utilizadas.	73
Tabla VIII. Número de cruces previstos y obtenidos entre ratones NMRI e YRT2.	80
Tabla IX. Número de embriones de 18,5 d.p.c y crías de 21,5 d.p.c obtenidos de los cruces entre ratones NMRI e YRT2 y entre NMRI y TyrTH.	80
Tabla X. Grupos de combinaciones de ARN.	82
Tabla XI. Genes diferencialmente expresados.	90
Tabla XII. Resultados de PCR cuantitativas con diferencias estadísticamente significativas.	93
Tabla XIII. Contajes de los conos de las retinas de ratones TyrTH y NMRI.	106
Tabla XIV. Resultados de los electrorretinogramas de respuesta a conos.	107
Tabla XV. Número de conos en las distintas áreas de contaje (A, B y C) de las retinas de los ratones 6132, 6137, 6244 y 6237.	110
Tabla XVI. Media del número de conos de la zona temporal de la retina.	111
Tabla XVII. Resultados de las observaciones de las microfotografías de los ratones analizados.	115
Tabla XVIII. Resultados de las observaciones de las microfotografías de los ratones analizados.	123
Tabla XIX. Cebadores diseñados para secuenciar las regiones codificantes del gen <i>Pten</i> .	131

Índice de Figuras y Tablas

Tabla XX. A- Gráfico de expresión génica en retina. 139

Tabla XX. B- Gráfico de expresión génica en retina. 140

Tabla XX. C- Gráfico de expresión génica en retina. 141

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text] 143

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text] 147

Tabla XXVI. Genes diferencialmente expresados en retina,
tras los análisis de **FIESTA** y **GEPAS**. 156

1. ALBINISMO

El albinismo se define como una condición genética causada por una deficiencia en la biosíntesis y/o transporte intracelular del pigmento melanina. La manifestación más común del albinismo es la hipopigmentación total o parcial de la piel, los ojos y el pelo (**Figura 1**) (Lluís Montoliu, 2009).

Esta falta de melanina puede tener causas muy diversas, desde la deficiencia en una enzima implicada en el proceso de síntesis de pigmento hasta un defecto en el desarrollo, provocando que determinadas zonas de cuerpo se encuentren sin melanocitos (Carden y col., 1998).

La reducción de la síntesis de melanina está asociada, entre otras alteraciones, con cambios en el sistema visual tales como hipoplasia foveal, anomalías en las conexiones nerviosas ojo-cerebro, nistagmus, estrabismo, reducción de la agudeza visual y pérdida de la visión binocular (Jeffery y col., 1997; Oetting y King, 1999; King y col., 2003a; Oetting y col., 2003). En casos de albinismo sindrómico, como el síndrome de Hermansky-Pudlak y Chediak-Higashi, también puede verse afectado el hematológico, el respiratorio y el gastrointestinal.

Tradicionalmente se pensaba que estas anomalías neurológicas en la visión no parecían ser el resultado de mutaciones en genes específicos de la biosíntesis de melanina, comunes en todos los tipos de albinismo; sino de una menor presencia de melanina durante el desarrollo del ojo (Oetting, 2000; Rachel y col., 2002). Sin embargo resultados recientes indican que la deficiencia de algunos intermediarios de la síntesis de melanina (como la L-DOPA) serían la causa del fenotipo visual asociado al albinismo (Lavado y col., 2006; Lopez y col., 2008).



Figura 1. Personas con distintos tipos de albinismo (Albinismo: una condición genética, dos realidades: España y Senegal, 2009).

1.1. Tipos de albinismo

A lo largo de la historia se han usado distintos criterios para clasificar los tipos de albinismos en humanos. En la actualidad se clasifican atendiendo al gen mutado (**Tabla I**). Hasta la fecha se han encontrado 15 genes asociados con el albinismo: cuatro genes asociados con el albinismo oculocutáneo (OCA), la tirosinasa (*TYR*, asociado con OCA1), el gen *OCA2* (asociado a OCA2), el gen que codifica para la tirosinasa relacionada a la proteína 1 (*TYRP1*, asociado a OCA3) y el gen codifica para una proteína transportadora asociada a la membrana (*SLC45A2*, asociado a OCA4).

Hay un gen asociado al albinismo ocular, el gen *GPR143* que codifica para un receptor acoplado a proteínas G, nueve genes asociados al síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) y un gen, *LYST*, al síndrome de Chediak-Higashi (CHS) (<http://www.cnb.csic.es/~albino/>).

Albinismo	Gen humano	Gen ratón	Mutaciones (HGMD)	FENOTIPO
OCA1	<i>TYR</i>	<i>Tyr</i>	296	ausencia parcial o total de pigmento en piel, pelo y ojo
OCA2	<i>OCA2</i>	<i>Oca2</i>	125	
OCA3	<i>TYRP1</i>	<i>Tyrrp1</i>	18	
OCA4	<i>SLC45A2</i>	<i>Slc45a2</i>	64	
OA1	<i>GPR143</i>	<i>Gpr143</i>	94	ausencia de pigmento en ojo
CHS1	<i>LYST</i>	<i>Lyst</i>	29	ausencia parcial o total de pigmento en piel, pelo y ojo pudiendo estar acompañada de inmunodeficiencia , insuficiencia respiratoria, problemas coagulación y/o degeneración neuronal
HPS1	<i>HPS1</i>	<i>Hps1</i>	26	
HPS2	<i>AP3B1</i>	<i>Ap3b1</i>	8	
HPS3	<i>HPS3</i>	<i>Hps3</i>	6	
HPS4	<i>HPS4</i>	<i>Hps4</i>	9	
HPS5	<i>HPS5</i>	<i>Hps5</i>	8	
HPS6	<i>HPS6</i>	<i>Hps6</i>	3	
HPS7	<i>DTNBP1</i>	<i>Dtnbp1</i>	2	
HPS8	<i>BLOC1S3</i>	<i>Bloc1s3</i>	1	
HPS9	<i>PLDN</i>	<i>Pldn</i>	1	

Tabla I. Clasificación de los tipos de albinismo. HGMD: Base de Datos de Mutaciones de Genes Humanos, Enero 2012 (*The Human Gene Mutation Database*).

La prevalencia de todas las formas de albinismo varía considerablemente (**Tabla II**), la estimación aproximada es 1/17.000 de los que al menos 1 de cada 70 personas son portadoras de alguna mutación en algún gen OCA (Gronskov y col., 2007).

OCA1 tiene una prevalencia aproximada de 1/40.000 en la mayoría de la población, menos en la población afroamericana que es relativamente poco común. Sin embargo, OCA2 es el tipo de albinismo más común en la población negra africana; la prevalencia en los blancos europeos es de 1/36.000 mientras que en los negros africanos es 1/3.900 y de 1/10.000 en los afroamericanos. OCA3 afecta a 1/8.500 individuos en África mientras que en la población caucásica y asiática es muy rara. Y finalmente OCA4 tiene

su mayor incidencia en la población japonesa con una prevalencia de 1/85.000 (Gronskov y col., 2007).

Gen	OCA	Prevalencia
<i>TYR</i>	OCA1	1:40.000
<i>OCA2</i>	OCA2	1:36.000 (blancos europeos) 1:3.900-10.000 (africanos)
<i>TYRP1</i>	OCA3	1:8.500 (africanos)
<i>SLC45A2</i>	OCA4	1:85.000 (japoneses)

Tabla II. Prevalencia de las formas de OCA.

El albinismo oculocutáneo humano es el resultado de un grupo de desórdenes genéticos recesivos de la ruta de síntesis de la melanina (**Figura 2**) (King y col, 2003).

El OCA más frecuente en anglosajones es el albinismo oculocutáneo tipo I (Hutton y Spritz, 2008). Se caracteriza por mutaciones en el gen de la tirosinasa en el cromosoma 11q14-21 (Tomita y col., 1989; Spritz y col., 1990; Carden y col., 1998), lo que provoca un déficit total o parcial de pigmento en piel, ojos y pelo. Individuos con OCA1 pueden tener una ausencia total de actividad tirosinasa (OCA1A) o tener una actividad residual postnatal (OCA1B). (Carden y col., 1998; Oetting y King, 1999).

En ratones, donde hay descritas más de un centenar de mutaciones en el locus *Tyr*, existe una mutación puntual en el exón 1 del gen, llamada “albina” (Yokoyama y col., 1990; Jackson y Bennet, 1990), que no altera la transcripción del gen, pero modifica el dominio catalítico de la enzima generándose una proteína no funcional (C203S), se bloquea la ruta de síntesis de melanina y en consecuencia se produce una ausencia absoluta de melanina (Russell y col, 1982; Kwon y col, 1987). Además de la pérdida de pigmento, tienen alteradas las funciones visuales (Jeffery y col., 1994 y 1997) y auditivas (Murillo-Cuesta y col., 2010).

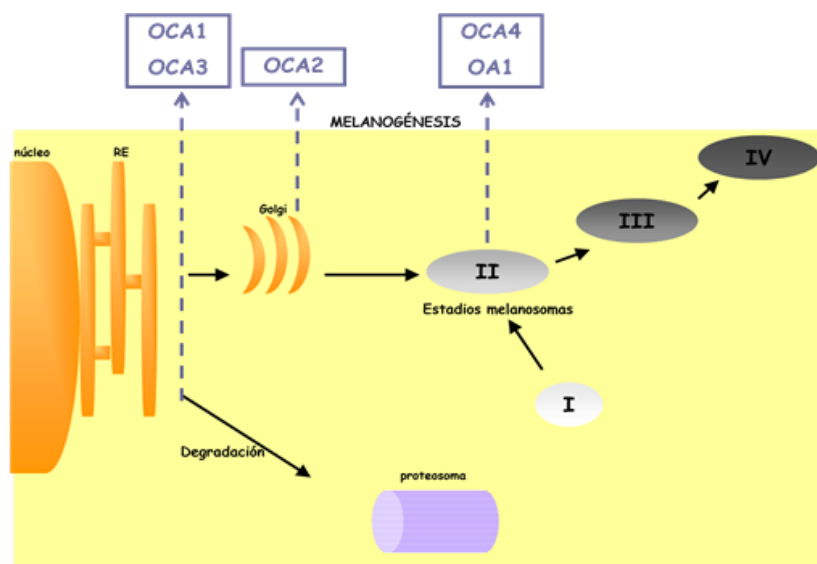


Figura 2. Correlación entre las proteínas melanosomales y los tipos de OCA y el OA1. La interrupción del tráfico de TYR y TYRP1 a nivel del retículo endoplasmático (RE) ocurre en OCA1 y OCA3, cuando la proteína mal plegada en vez de pasar al aparato de Golgi para su procesamiento es desviada al proteosoma para su degradación. En OCA2 y OCA4, la enzima es secretada anormalmente, en OCA2 inmediatamente después de su procesamiento en el Golgi y en OCA4 en el estadio II de maduración de los melanosomas (basado en Ray y col., 2007).

El albinismo oculocutáneo tipo 2 se debe a la mutación del gen que codifica para polipéptido OCA2 en el cromosoma 15q11-12. El gen consiste en 24 exones que codifica para una proteína de 838 aminoácidos (King y col., 2003b; Dessinioti y col., 2009).

Dicha proteína es importante para biogénesis normal de los melanosomas y para el correcto procesamiento y transporte de las proteínas melanosomales como TYR y TYRP1 (Gronskov y col., 2007). Los efectos de las mutaciones en el polipéptido OCA2 pueden ser moduladas por variaciones en el gen *MC1R* dando colores de pelo rojo (King y col., 2003b).

El equivalente en ratón es la mutación en el gen que codifica para el producto del locus *OCA2* que codifica para una proteína con 12 dominios transmembrana (Gardner y col., 1992; Rinchik y col., 1993) que reduce la producción de eumelanina en los melanocitos y en el epitelio pigmentado de la retina (Hirobe y col., 2003).

OCA3 se debe a las mutaciones en el gen *TYRP1* localizado en el cromosoma humano 9q23 (Dessinioti y col., 2009), está formado por 8 exones que codifica para una proteína de 536 aminoácidos. TYRP1 participa en la vía de síntesis de melanina catalizando el paso del ácido carboxi-5,6-dihidroxi-indol (DHICA) a melanina. Estudios en melanocitos de ratón muestran que Tyrp1 actúa como estabilizante de Tyr y que mutaciones *Tyrp1* causan alteraciones en la maduración y degradación de Tyr (Gronskov y col., 2007).

OCA 4 es el tipo de albinismo oculocutáneo descubierto más recientemente; se caracteriza por la mutación en el gen *SLC45A2* localizado en el cromosoma humano

5p13.3, consiste en 7 exones que codifican para la proteína transmembrana SLC45A2. Su función se desconoce pero algunos estudios en peces sugieren que actúan como transportadores de membrana en los melanosomas (Gronskov y col., 2007).

OA1 es un tipo de albinismo cuya hipopigmentación afecta fundamentalmente al ojo. Esta causado por la alteración del gen *GPR143* que se localiza en el cromosoma Xp22.3-22.2. Este gen codifica para una proteína del compartimento endosomal/lisosomal que se encargaría de la formación de los melanosomas, su mutación provoca acúmulos macromelanosomales (los premelanosomas no se separan del complejo retículo endoplasmático-Golgi) (Bassi y col., 1995; Carden y col. 1998, Palmisano y col., 2008;).

Por otro lado hay una serie de albinismos sindrómicos que cursan con una sintomatología variada, además de la hipopigmentación.

El síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) está causado por mutaciones en un grupo heterogéneo de genes, hasta el momento se han descrito 9 genes causantes de diferentes subtipos de HPS (HPS 1-9). Estos genes codifican para proteínas que intervienen en la biogénesis y/o función de orgánulos relacionados con los lisosomas, encargados de la formación de melanosomas en las células pigmentarias (melanocitos y epitelio pigmentado de la retina) y otras vesículas intracitoplasmáticas similares a otros tipos celulares. La sintomatología más común es una inmunodeficiencia severa, fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa y alteraciones de las plaquetas (Gronskov y col., 2007; Dessinioti y col., 2009).

El síndrome de Chediak-Higashi (CHS) se caracteriza por la mutación del gen *LYST*. La proteína LYST es una proteína del citosol que interviene en el transporte de vesículas. Individuos con CHS presentan agregados vesiculares como por ejemplo de lisosomas, de melanosomas, de plaquetas etc. Se caracterizan por tener una mayor susceptibilidad a infecciones por bacterias, hipopigmentación, hemorragias, neuropatías etc. (Gronskov y col., 2007, Dessinioti y col., 2009).

Existen alteraciones genéticas adicionales similares al albinismo que también cursan con hipopigmentación pero que presenta un fenotipo más complejo y por tanto no se las clasifica habitualmente dentro de los albinismos. Un ejemplo de ello es el síndrome de Griscelli (GS) que se debe a la alteración en la formación del complejo Rab27a-Mlph-MyoVA, que se encarga del transporte de los melanosomas a través de la red de actina en los melanocitos. Hay tres tipos de GS: el GS1 se manifiesta con albinismo, alteraciones neurológicas, cierto retardo mental etc. Es atribuido a la mutación del gen *MYO5A* que codifica para la proteína motora miosina VA. GS2 cursa con albinismo, defectos inmunes letales y alteraciones hematológicas. Es causado por la mutación en *RAB27A* que codifica para una pequeña proteína GTPasa involucrada en la vía de secreción intracelular. GS3 resulta de la mutación del gen que codifica para la *melanophilin* (*MLPH*); a diferencia de los otros dos subtipos esta solo presenta manifestaciones dermatológicas.

Otro ejemplo de síndrome que cursa con hipopigmentación es el síndrome de Waardenburg (WS), desorden genético que se caracteriza por piebaldismo y sordera neurosensorial. La sordera está asociada a la ausencia de melanocitos en la estría vascular de la cóclea. Dependiendo del tipo de mutación podemos clasificarlos en cuatro subtipos: el WS1 caracterizado por alteraciones en la pigmentación, anomalías craneofaciales pudiendo cursar también con sordera. El WS3 es una variante de WS1 que además de la sintomatología descrita presenta ciertas anomalías musculoesqueléticas. Ambas resultan de la mutación del gen *PAX3*, cuya proteína codificante juega un papel relevante en la regulación de la expresión de *MITF*; también parece ser importante en el desarrollo del tejido óseo y cartilaginoso. Los casos de WS2 se atribuyen principalmente a mutaciones en el gen de *MITF*. El WS4 presenta un fenotipo similar al WS1, además de megalocolon aganglional congénito debido a la falta de neuronas en el plexo neural del intestino (Gronskov y col., 2007; Dessinioti y col., 2009).

1.2. Anomalías visuales asociadas al albinismo

Además de la ausencia de pigmentación en la piel, en el pelo y en el ojo, aparecen una serie de anomalías visuales en los individuos albinos.

La primera vez que se describió la posibilidad de que las ratas albinas presentaran una menor respuesta visual fue en 1965 por parte de Sheridan; posteriormente aparecieron diversos trabajos en gatos, conejos y hurones albinos que confirmaban ese déficit visual (Guillery, 1969; Giolli y Guthrie, 1969; Guillery, 1971).

Las anomalías visuales que presentan los individuos albinos son principalmente cuatro:

Subdesarrollo de la zona central de la retina: en la zona central de la retina de individuos albinos hay un menor número de células especializadas; esto provoca que tengan una pérdida de agudeza visual (Jeffery y col., 1997). En primates los individuos albinos carecen de fovea.

Alteraciones en el desarrollo de la retina: en ratas y ratones albinos, durante el desarrollo y diferenciación de la neurorretina se ha observado un mayor número de figuras mitóticas, y subsiguiente aumento de las figuras picnóticas, que en los ratones pigmentados (Giménez y col., 2005).

Proyecciones quiasmáticas anómalas: en individuos pigmentados las proyecciones axonales de las células ganglionares de la zona nasal de la retina se proyectan al lado opuesto del cerebro (conexiones contra laterales) y las de la zona temporal de la retina se dirigen al mismo lado del cerebro (conexiones ipsilaterales), esta característica es la base fisiológica de la visión tridimensional. En los individuos albinos muchas de las conexiones que deberían ser ipsilaterales son desviadas, durante el desarrollo, hacia las proyecciones contralaterales. Esto provoca la

alteración de la visión estereoscópica y una pérdida de la profundidad del campo visual (Jeffery y col., 1994).

Déficit de bastones: los individuos albinos tienen un déficit de aproximadamente un 30% en el número de bastones, lo cual limita de forma importante su visión nocturna y en penumbra (Jeffery y col.1997).

1.3. Anomalías auditivas asociadas al albinismo

Con frecuencia las sorderas hereditarias están asociadas con desórdenes pigmentarios tales como el síndrome de Waardenburg, el Piebaldismo, etc. Estos síndromes se caracterizan por cursar con un albinismo parcial ocular u oculocutáneo.

Estudios de audición en ratones albinos OCAI, en los que se detectó una sordera profunda prematura y una incapacidad a recuperar los umbrales auditivos normales tras la exposición a ruido intenso, sugieren que precursores de la melanina, como la L-DOPA, son suficientes para rescatar las alteraciones auditivas observadas en ratones albinos. El mecanismo de acción se desconoce, pero parece ser que la melanina y/o la L-DOPA intervienen en la homeostasis del calcio de la endolinfa, producida por la estría vascular de la cóclea, dónde los melanocitos están localizados (Murillo-Cuesta y col., 2010).

2. MELANINA

2.1. Células melanogénicas

En mamíferos, la síntesis de melanina se lleva a cabo en dos tipos celulares de distinto origen embrionario: los melanocitos y las células del epitelio pigmentado de la retina (**Figura 3**). Los melanocitos, que están presentes en diversas localizaciones del cuerpo (por ejemplo, en los folículos pilosos, en la estría vascular del oído interno, en el coroides, en el iris, en las válvulas del corazón, etc), provienen de células precursoras de la cresta neural mientras que las células del epitelio pigmentado de la retina proceden del neuroectodermo de la copa óptica, cuyo origen embrionario es el tubo neural.

La melanina se produce y almacena en un tipo especializado de orgánulos subcelulares relacionados con los lisosomas denominados melanosomas, donde tiene lugar la melanogénesis. Se sintetizan dos tipos de melanina: eumelanina (pigmento de color marrón-negro) y feomelanina (pigmento de color amarillo-rojo) (Carden y col., 1998; Murisier y Beermann, 2006; Ando y col., 2007).

En los melanosomas se distinguen cuatro etapas de maduración (I-IV) (**Figura 2**), determinadas por la estructura del melanosoma y la cantidad, calidad y disposición de la melanina producida en él. El melanosoma en estadio I es una vacuola esférica vacía sin actividad tirosinasa, en el estadio II se empieza a desarrollar las fibrillas internas, hay actividad tirosinasa y un mínimo depósito de melanina, en el estadio III comienza la síntesis de melanina que se va disponiendo en las fibrillas internas y finalmente en el estadio IV los melanosomas tienen forma elipsoide, están completamente cargados de melanina y apenas presentan actividad tirosinasa (Costin y Hearing, 2007).

En la piel, los melanocitos transfieren los melanosomas cargados con melanina a los queratinocitos de los estratos superiores de la epidermis, para dar lugar a la pigmentación en la piel y el pelo.

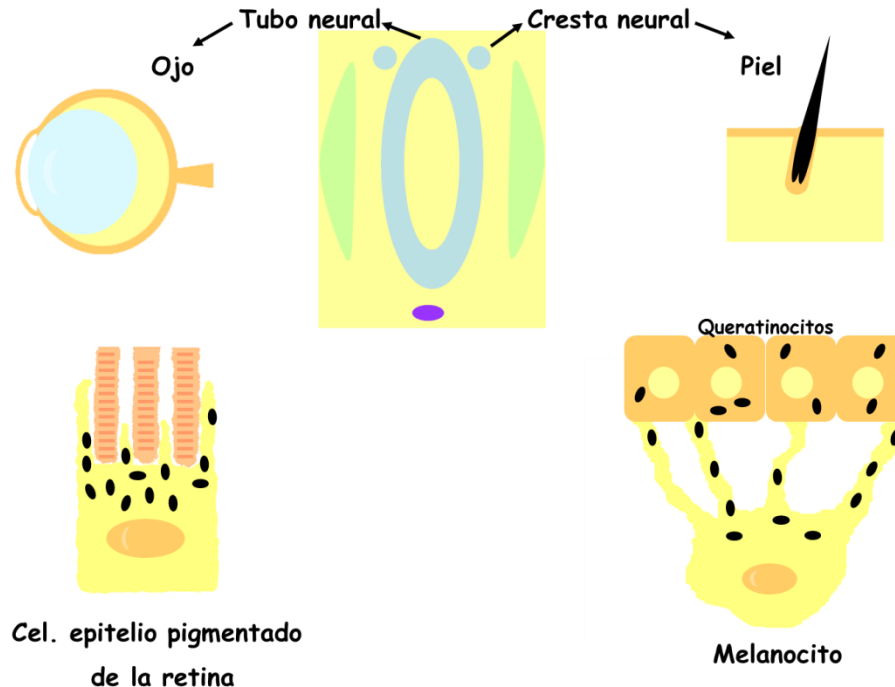


Figura 3. Origen embrionario de los tipos celulares que sintetizan melanina (basado en Murisier y col., 2006; Ando y col., 2007).

2.2. Melanogénesis

En mamíferos, las enzimas implicadas en la síntesis de melanina incluyen la tirosinasa (Tyr), la proteína 1 relacionada a la tirosinasa (Tyrp1) y la proteína 2 relacionada a la tirosinasa (Tyrp2, también llamada dopacromo tautomerasa, Dct).

Las tres enzimas son glicoproteínas transmembrana tipo I, sintetizadas por los ribosomas en las células melanocíticas y transportadas al retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi para su procesamiento post-traducciona l y posterior glicosilación.

A partir de ese momento se incorporan a la membrana de los melanosomas en estadio I pasando, en ese momento, al estadio II para la síntesis de melanina (García-Borrón y Olivares Sánchez, 2011).

La tirosinasa (*monophenol, 3,4-dihydroxyphenylalanine oxygen oxidoreductase*, EC 1.14.18.1) es la enzima clave de la melanogénesis mientras que Tyrp1 y Tyrp2 están más implicadas en la modificación de los distintos tipos de melanina. Además de estas enzimas los melanosomas contienen otras proteínas específicas que tienen una función más estructural o se encargan de la regulación del pH del interior del melanosoma, como

por ejemplo Pmel17 que determina los cambios estructurales del paso del melanosoma en fase I a fase II (Costin y Hearing, 2007).

2.2.1. Tirosinasa

El gen de la tirosinasa se localiza en el locus *Tyr*, en el cromosoma 7 de ratón y en el cromosoma 11 humano (Regales y col., 2003); se expresa solamente en las células del epitelio pigmentado de la retina y en los melanocitos (Beermann y col., 1992; Giménez y col., 2003).

El inicio de la expresión del gen de la tirosinasa de ratón es a partir del día +10,5 d.p.c. en las células de EPR y del día +16,5 d.p.c. en los melanocitos (Beermann y col., 1992; Steel y col., 1992; Giménez y col., 2003).

La regulación de la expresión del gen de la tirosinasa, y por tanto de la melanogénesis, viene determinada por la respuesta combinada de los melanocitos a la radiación UV, a la proteína Agouti, a la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), a endotelinas, a factores de crecimiento, a citoquinas entre otras, que desencadenan la activación de varias vías de señalización que regulan en última instancia la expresión del gen *Tyr* (Costin y Hearing, 2007; Easty y col., 2011).

La radiación UV actúa sobre los melanocitos incrementando la expresión de la preopiomelanocortina, (POMC, precursor de α -MSH), de los receptores de melanocortina I, de la tirosinasa, de TYRP1, de la proteína quinasa C (PKC) y de otros factores de señalización. Por otro lado, también estimula la producción de endotelina-1 (ET-1) y POMC por los queratinocitos, que actúan a su vez de manera paracrina en la estimulación de la función de los melanocitos (Costin y Hearing, 2007; Easty y col., 2011).

La hormona α -MSH se une al receptor MCR-1, el cual activa a la adenilato ciclasa a través de la proteína G provocando un aumento de los niveles de AMP cíclico. El AMP cíclico a través de la proteína quinasa A (PKA) fosforila la proteína CREB que se une al elemento CRE y ambos a su vez al promotor M del gen que codifica para el factor de transcripción asociado a microftalmía (MITF). El incremento de expresión de MITF induce la expresión de TYR, TYRP1 y TYRP2 (Costin y Hearing, 2007; Easty y col., 2011).

La proteína de señalización Agouti puede inhibir la vía de síntesis de eumelaninas y favorecer la vía de síntesis de feomelaninas, mediante la antagonización de la vía de señalización de AMP cíclico e inhibiendo MGRN1 (*mahogunin*), ambas rutas favorecen niveles de expresión bajos del gen *MITF*. Niveles bajos de *MITF* favorece la síntesis de feomelaninas frente a la síntesis de eumelaninas (Hida y col., 2009).

Las prostaglandinas (PG) E2 y F2 α , secretadas por los queratinocitos, intervendrían en la formación de las dendritas de los melanocitos mediante la fosfolipasa C (FLC) (Costin y Hearing, 2007; Easty y col., 2011).

Otros factores que derivan de los queratinocitos, como por ejemplo el factor de crecimiento nervioso (NGF), también actúan sobre la regulación o diferenciación de los melanocitos actuando sobre la vía de la proteína quinasa activadoras de mitosis (MAPk) que a su vez regula la expresión de *Tyr* (Figura 4) (Costin y Hearing, 2007; Easty y col., 2011).

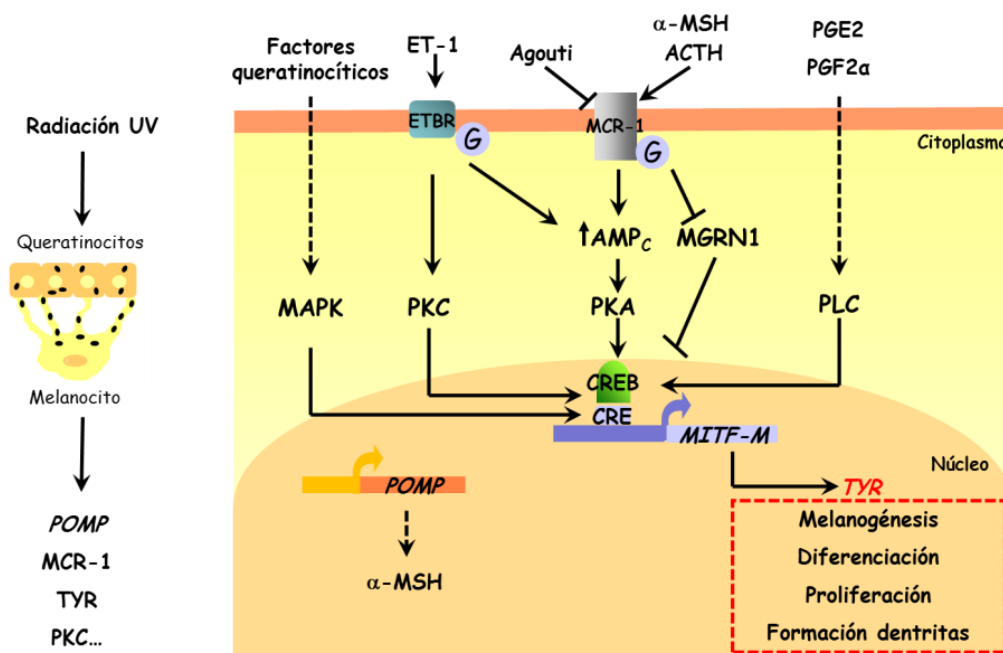


Figura 4. Esquema de las rutas que regulan la expresión del gen *TYR*.

El procesamiento celular de la tirosinasa se realiza en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi. En el RE la tirosinasa se glicosila y se pliega correctamente, de ahí pasa al Golgi donde se incorporan los dos átomos de cobre. La tirosinasa después de su maduración en el aparato de Golgi puede seguir dos vías: una es hacia el melanosoma en estadio II para la síntesis de melanina, para ello la PKC- β la fosforila o hacia la vía de degradación donde puede volver a RE y de ahí al proteosoma o seguir la vía de degradación endosomal/lisosomal (Figura 5) (Ando y col., 2007).

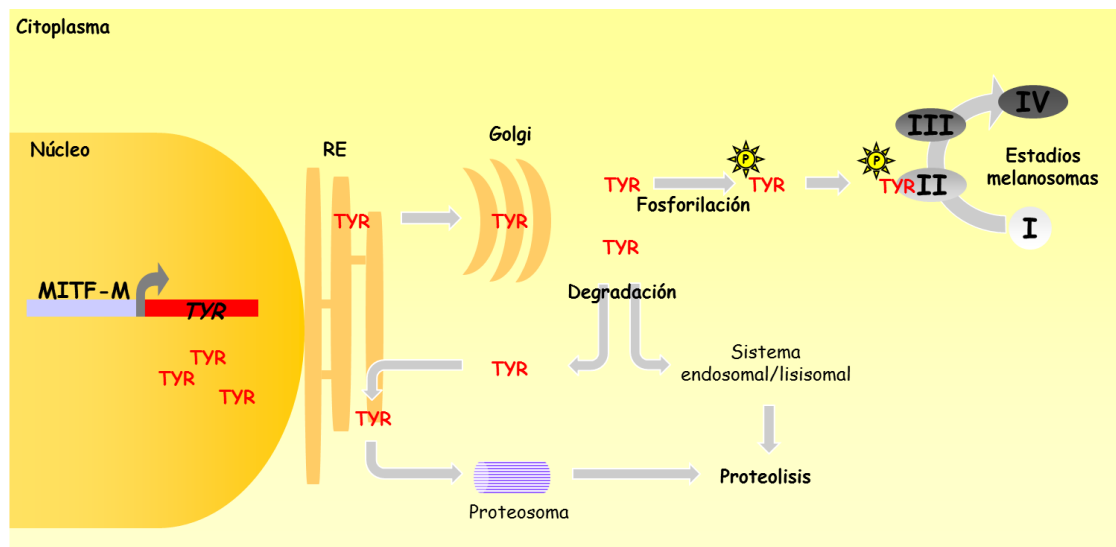


Figura 5. Procesamiento y degradación de la tirosinasa (TYR) (basado en Ando y col., 2007).

La tirosinasa es una glicoproteína transmembrana con el extremo C-terminal en el lumen del melanosoma, posee varios sitios de N-glicosilación y con el extremo N-terminal hacia la matriz del melanocito. Está unida en sus centros activos a dos átomos de Cu (CuA y CuB). Dependiendo de la ausencia/presencia de oxígeno y del estado de oxidación de los átomos de Cu, la enzima puede presentarse de tres formas, llamadas met, oxy y deoxy (García-Borrón y Olivares Sánchez, 2011). Mutaciones en los sitios de glicosilación también alteran la funcionalidad enzimática de la tirosinasa (Lavado y col., 2005).

2.2.2. Biosíntesis de melanina

El paso inicial en la síntesis de melanina, catalizado por la tirosinasa, es el paso de la l-tirosina a dopaquinona. A partir de aquí se puede sintetizar eumelaninas o feomelaninas (Hearing, 2011).

La producción de feomelaninas depende de la conjugación de la dopaquinona con el grupo tiol del aminoácido cisteína o del glutatión reducido para formar cisteinildopa o glutatiónildopa (una dipeptidasa catalizaría el paso a cisteinildopa). La cisteinildopa tras someterse a varios reordenamientos estructurales y a su deshidratación se forma la benzotiacilalanina. Y finalmente se formarían las feomelaninas (García-Borrón y Olivares Sánchez, 2011).

La síntesis de eumelaninas comienza con el paso de dopaquinona a ciclodopa de forma espontánea, ésta es muy inestable y progresa rápidamente a L-dopa y L-dopacromo. Por acción de la tirosinasa la L-dopa se vuelve a oxidar a dopaquinona (Hearing, 2011). L-dopacromo puede seguir dos vías: la primera, dar lugar al ácido dihidroxi-indol-carboxílico (DHICA) y posteriormente al ácido indol-5,6-quinona carboxílico (IQCA) para finalmente dar lugar a la eumelanina, estos pasos están catalizados por TYRP2 y TYRP1 respectivamente. O la segunda vía, transformarse en 5,6-Dihidroxiindol y

mediante la acción de la tirosinasa en Indol-5,6-quinona (IQ) para concluir con la formación también de eumelanina (Murisier y Beermann., 2006; Ando y col., 2007; Ebanks y col., 2009; García-Borrón y Olivares Sánchez, 2011) (**Figura 6**).

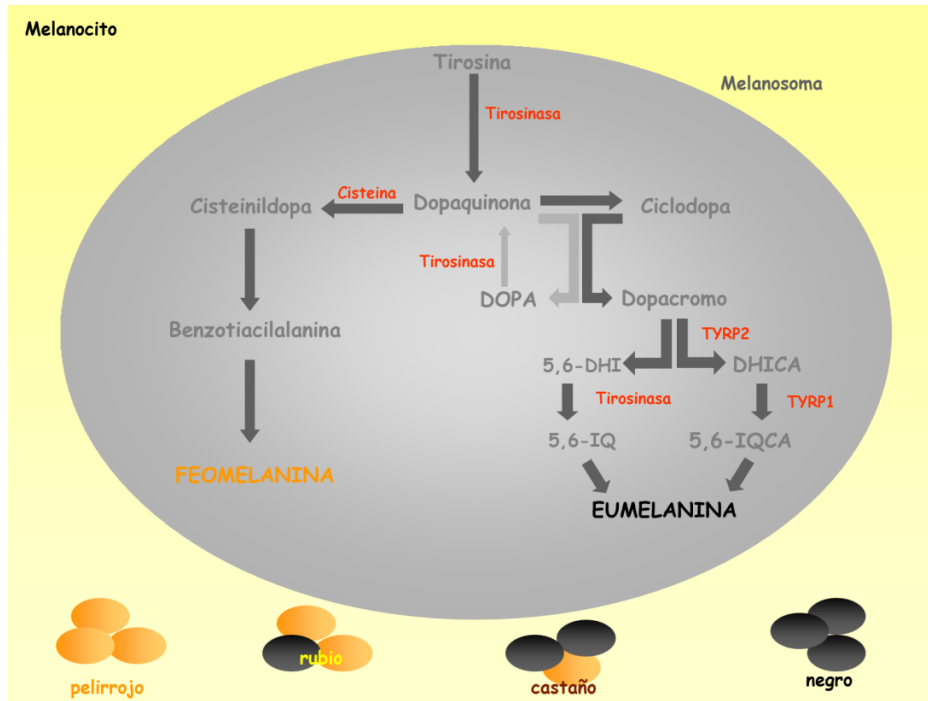


Figura 6. Ruta de biosíntesis de melanina en el melanocito.

La mezcla de estas dos sustancias en diferentes proporciones, junto con los distintos niveles de expresión del gen de la tirosinasa y de otros genes de la vía de biosíntesis de la melanina, son los principales responsables de los variados tipos de coloración de los ojos, de la piel y del pelo.

3. SISTEMA VISUAL

El sistema visual de los vertebrados se encarga de percibir los estímulos luminosos, transformarlos en impulsos nerviosos y transferirlos al cerebro para su procesamiento.

3.1. Origen embrionario

En el desarrollo del ojo de los vertebrados, el tejido ectodérmico se diferencia en las tres estructuras principales del ojo: la neurorretina y el epitelio pigmentado de la retina (EPR), que se originan a partir del neuroectodermo de la vesícula óptica y la lente o cristalino, que se desarrolla a partir del ectodermo superficial (Horsford y col., 2005).

Durante el desarrollo embrionario, antes de la formación del tubo neural se forman dos pequeñas depresiones en el neuroectodermo denominadas foveolas ópticas, que constituyen los primordios de la retina. Una vez formado y diferenciado el tubo neural, a partir del diencéfalo (parte del prosencéfalo) se diferencian dos evaginaciones simétricas laterales que constituyen las vesículas ópticas. Cada vesícula se dirige hacia el ectodermo superficial en el territorio de la placoda óptica. La acción inductora de la vesícula óptica provoca una proliferación a nivel de la placoda y un hundimiento del material proliferado que se diferencia en el cristalino; también induce al ectodermo y al mesodermo suprayacente, que dará lugar a la córnea (**Figura 7**) (Martínez-Morales y col., 2004).

Por otro lado, la vesícula óptica sufre una serie de transformaciones que se pueden resumir en los siguientes acontecimientos (Smith, 2001):

1. Invaginación frontal de la vesícula transformándose en una copa de pared doble (neuroectodermo).
2. Desplazamiento del cristalino hacia la embocadura de la copa.
3. Coalescencia de la parte invaginada con la invaginante quedando así las paredes de la copa como dos láminas celulares, menos en la parte posteroinferior.
4. La capa exterior de la copa se transforma en lo que será el futuro epitelio pigmentado de la retina; la anterior en las otras nueve capas. En la penúltima de ellas, las fibras ópticas convergen hacia el fondo del tallo entre las células gliales en diferenciación, hasta alcanzar el diencéfalo.
5. El mesodermo circundante proporciona a nivel del globo ocular, las tunicas coroides y escleral, con todos sus derivados y a nivel del pedículo, la envoltura conjuntiva para el nervio óptico, más los vasos retinianos e hialoideos.

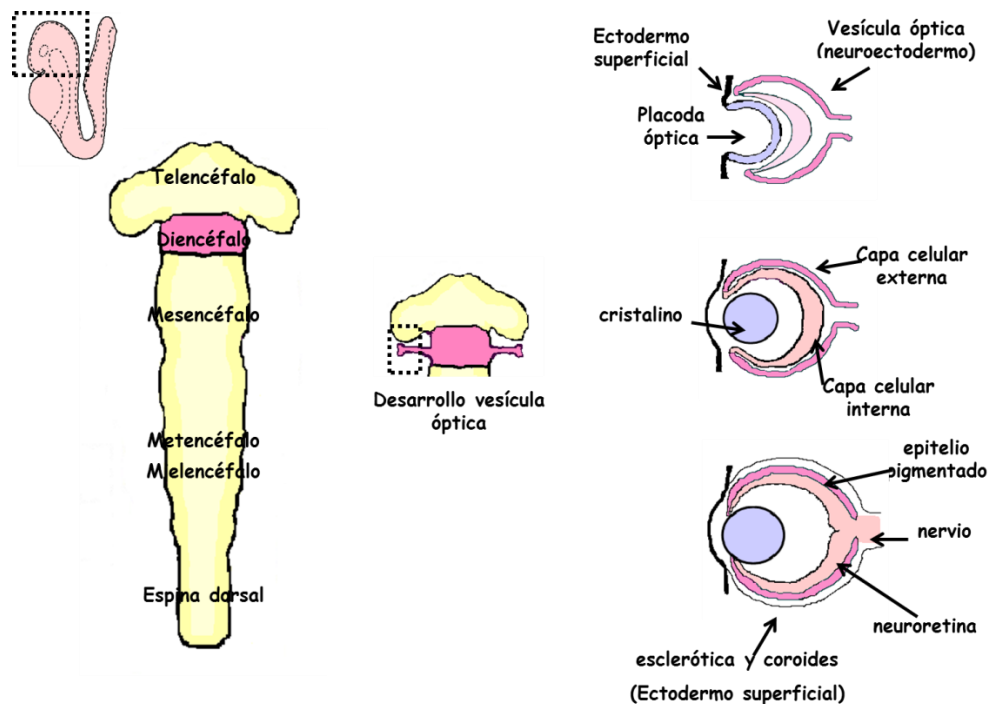


Figura 7. Desarrollo embrionario de un ojo de ratón.

Desde el punto de vista molecular, para el correcto desarrollo del ojo se precisa de la activación de una serie de factores de señalización, en dos gradientes, uno dorso-ventral y otro distal-proximal. Estos factores de señalización interactúan con los factores de transcripción clave para la diferenciación de los tres dominios de la vesícula óptica: el distal que dará lugar a la futura neuroretina, el proximal que dará lugar al nervio óptico y el dorsal que dará lugar al EPR (Bharti y col.; 2006).

Los factores de señalización *activin-like*, procedentes del mesenquima extraocular, actúan a favor de la diferenciación de las células de la vesícula óptica en el EPR y los factores de señalización FGF, procedentes de la placoda óptica, inhiben la diferenciación de las células en EPR pero activan la diferenciación de la neuroretina (Martínez-Morales y col., 2004; Fuhrmann, 2010).

En vertebrados, las células que componen la vesícula óptica, inicialmente, son indistinguibles morfológica y molecularmente; todas ellas co-expresan factores de transcripción requeridos para las fases iniciales de desarrollo del ojo como son: *Otx2*, *Pax6*, *Rx*, *Six3* y *Lhx2*.

El factor de transcripción retinal *Rx/RAS* juega un papel clave en las fases iniciales de la formación del ojo, concretamente en la fase de evaginación de la vesícula óptica, además de ser esencial para la expresión de otros factores de transcripción imprescindibles para el desarrollo del ojo, como son: *Pax6*, *Lhx2*, *Otx2* o *Six3* (Fuhrmann, 2010).

En la diferenciación EPR los factores de transcripción clave son *Mitf* y *Otx2* y en el desarrollo de la neuroretina *Vsx2* (anteriormente llamado *Chx10*), que a su vez inhibe a *Mitf*, y *Sox2* (Horsford y col., 2005; Fuhrmann, 2010).

3.2. Anatomía del sistema visual

El sistema visual se puede dividir anatómicamente en el globo ocular, nervio óptico, quiasma óptico, núcleo geniculado lateral y colículo superior.

El ojo está constituido por diversas capas. La más externa es la esclerótica, la media la coroides y la más interna la retina; la parte anterior del ojo está cubierta por una membrana transparente llamada córnea y en la parte posterior del ojo se encuentra el nervio óptico. El interior del ojo se divide en dos cámaras; la cámara anterior, rellena de humor acuoso, donde se encuentra el iris y la pupila y la cámara posterior donde se localiza el cristalino embebido en humor vítreo.

Los nervios ópticos abandonan el ojo por la parte posterior del globo ocular. Ya en el cerebro se encuentra el quiasma óptico donde la mitad de las fibras de cada ojo cruzan al lado opuesto del cerebro (conexiones contra-laterales) y la otra mitad van al mismo lado del cerebro (conexiones ipsi-laterales) formando los tractos ópticos. Esto ocurre en primates y felinos, por ejemplo; mientras que en ratones y otros roedores el cruce de fibras es de un 5% aproximadamente.

Los tractos ópticos se dirigen hacia los cuerpos geniculados laterales del tálamo, donde se procesa la información; y de allí, a través del tracto geniculo-calcarino, hacia la corteza visual (lóbulo occipital).

El núcleo supraquiasmático del hipotálamo se encarga de la regulación de los ritmos circadianos, el núcleo pretectal de la fijación visual y reflejos pupilares y los tubérculos cuadrigéminos de la coordinación de los movimientos oculares (Figura 8) (Smith, 2001).

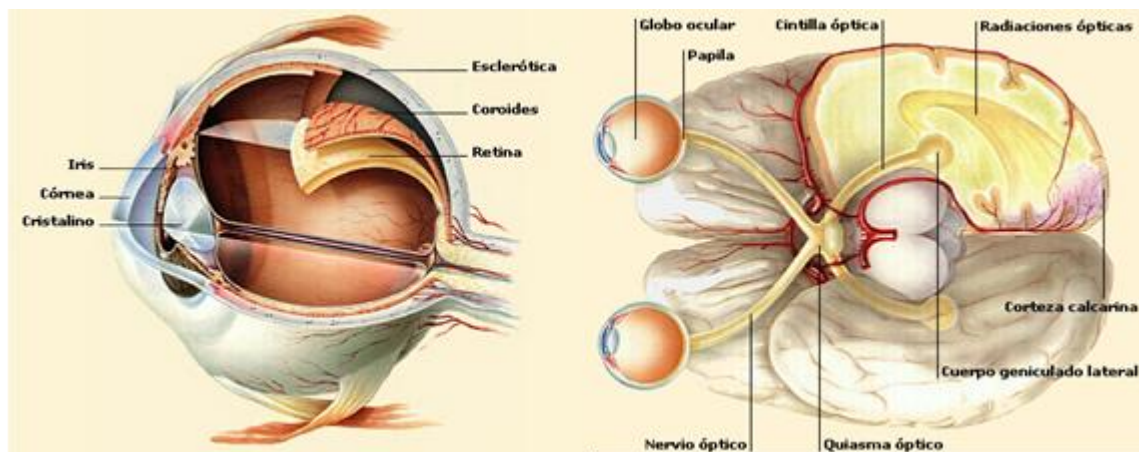


Figura 8. Estructura general del sistema visual humano.

3.3. Estructura general de la retina

La retina es una lámina translúcida de tejido nervioso que tapiza la parte interna del globo ocular y es la encargada de procesar la información visual.

Estructuralmente se puede dividir en 10 capas que desde la coroides hacia el humor vítreo son (**Figura 9**) (Smith, 2001; Swaroop y col., 2010):

1. Epitelio pigmentado de la retina (EPR): la membrana plasmática del polo basal presenta un laberinto de interdigitaciones típicas de las células dedicadas al transporte activo. La membrana plasmática del polo apical presenta dos tipos de diferenciaciones, láminas cilíndricas que rodean el extremo distal de los segmentos externos de los fotorreceptores y microvellosidades que ocupan los intersticios entre los fotorreceptores. Las células están ocupadas por numerosas mitocondrias, gránulos de melanina y cuerpos residuales.
2. Capa de fotorreceptores (F): en ella se encuentra los segmentos externos e internos de los conos y los bastones de la retina, cuya anatomía completa se extiende hasta la capa quinta.
3. Membrana limitante externa (MLE): delgada línea formada por filamentos relacionados con zónulas adherentes que se forman entre la región basal de los segmentos internos de las células fotorreceptoras y los aplanamientos terminales de las prolongaciones de las células de Müller.
4. Capa nuclear externa (NE): formada por los cuerpos celulares de los conos y bastones.
5. Capa plexiforme externa (PE): capa donde se producen las sinapsis entre los axones de conos y bastones, las dendritas de las neuronas bipolares de la capa adyacente y las células horizontales de Cajal.
6. Capa nuclear interna (NI): formada principalmente por los somas de las células de Müller, células horizontales de Cajal, neuronas bipolares y células amacrinas (neuronas con numerosas dendritas que se ramifican por la capa plexiforme interna).
7. Capa plexiforme interna (PI): compleja red de prolongaciones de células amacrinas, bipolares y ganglionares, formando sinapsis entre ellas.
8. Capa de células ganglionares (CG): grandes neuronas multipolares, cuyas dendritas apicales hacen sinapsis en la capa plexiforme interna y su axón forma parte de las fibras del nervio óptico, que se dirigen al cerebro.
9. Capa de fibras del nervio óptico (FNO): contiene los axones de las células ganglionares que constituyen el origen del nervio óptico.
10. Membrana limitante interna (MLI): constituida por los pies de las células de Müller se localiza en el interior de la capa FNO.

La señal luminosa es absorbida y reflejada por el EPR; los fotorreceptores captan la señal luminosa, la transforman en eléctrica y la transmiten verticalmente en forma de impulsos nerviosos a las células bipolares en la CPE. Por otro lado, las células horizontales se encargan de modular la señal, también en la CPE. En la CPI la

Introducción

información proveniente de las células bipolares es procesada conjuntamente por las células amacrinas y ganglionares. Los axones de estas últimas constituyen el nervio óptico, a través del cual se envía la información visual al cerebro.

A continuación se describe con más profundidad aquellos tipos celulares que tienen más interés para la presente tesis: células epitelio pigmentado de la retina, fotorreceptores, células bipolares y horizontales.

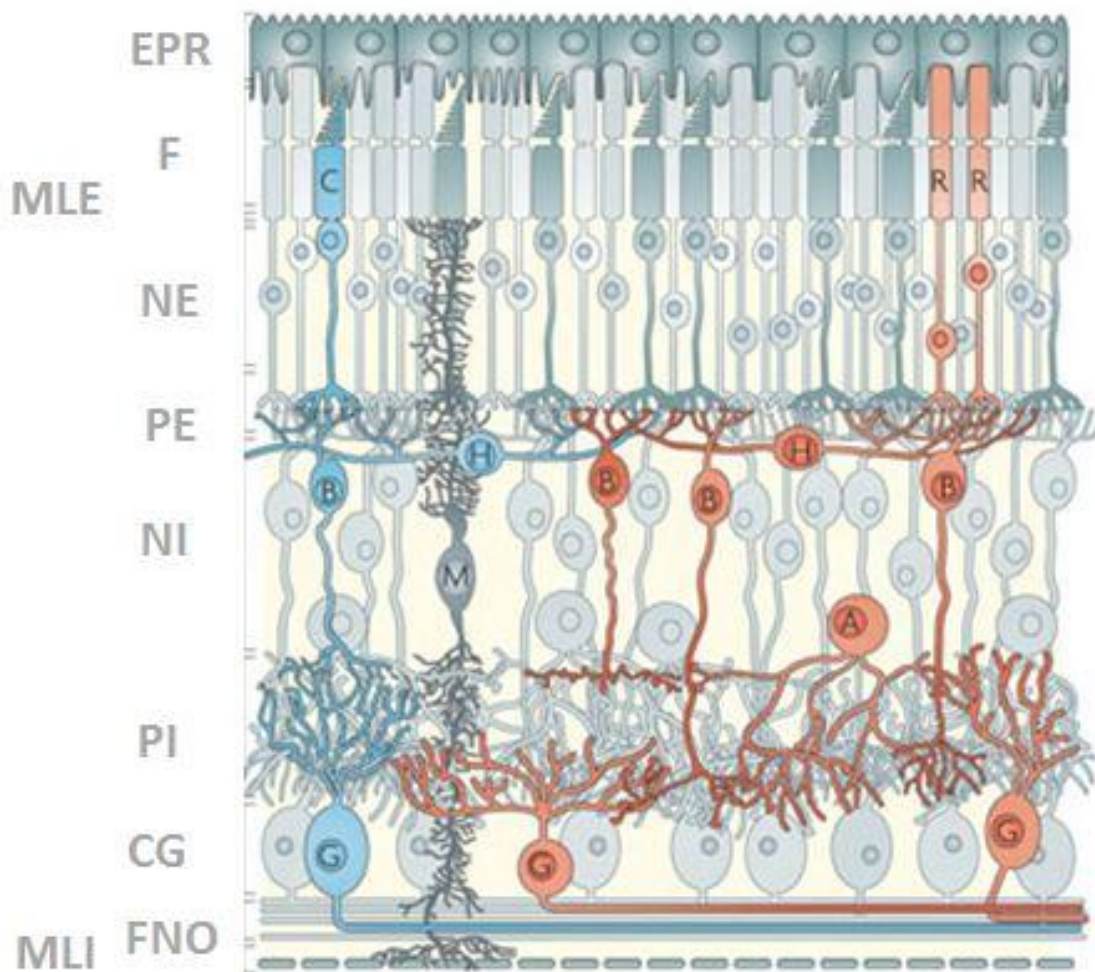


Figura 9. Estructura general de la retina (ver texto). C-cono, R- bastones, B-células bipolares, H- células horizontales, A- células amacrinas, G- células ganglionares, M- célula de Müller. En azul, vía de transmisión de la señal eléctrica desde los conos. En rojo, vía de transmisión de la señal eléctrica desde los bastones (Modificado de Swaroop y col., 2010).

3.4. Tipos celulares de la retina

3.4.1. Epitelio pigmentado de la retina

El EPR, monocapa de células pigmentadas situada entre la neurorretina y el coroides, juega un papel crucial en la organogénesis y en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad de la retina (Bharti y col., 2006; Kevany y Palczewski, 2010). Se caracteriza por la presencia de melanosomas, que sintetizan y almacenan el pigmento melanina (Martínez-Morales y col., 2004).

Los melanosomas del EPR no se transfieren a las células adyacentes, como ocurre en los melanocitos de la piel, que se transfieren del melanocito al queratinocito, sino que se desplazan intracelularmente. Se encargan de la absorción de la luz que entra en el ojo (para evitar su dispersión) y de la detoxificación de los intermediarios oxidativos (Barral y Seabra, 2004).

Su membrana apical está en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores y su membrana basolateral con la membrana de Bruch, que separa las células del EPR del endotelio fenestrado de los capilares coroides.

La membrana de Bruch representa una interfaz de intercambio de nutrientes y señales moleculares entre el EPR y la capa corioidea. Tiene vital importancia en la comunicación célula-célula, en la diferenciación, proliferación y migración celular, así como en la remodelación tisular y en la formación de los procesos patológicos (Booij y col., 2010). La membrana de Bruch se puede ver engrosada con la edad o por determinadas patologías, provocando un ralentizamiento en el transporte de metabolitos. Esta circunstancia puede conducir, entre otras cosas, a la formación de drusas, depósitos laminares sobre la membrana o a nivel intracelular, vacuolización del tejido; alteraciones presentes en diversas patologías degenerativas de la retina como por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad (Wang y Kefalov, 2011) o la acromatopsia (Simunovic, 2010).

El EPR (BHR externa) junto con las células endoteliales (BHR interna) constituyen la barrera hematorretiniana (BHR), encargada de mantener el entorno especializado de la retina neural. Por tanto, controla la transferencia de fluidos y solutos así como impide la entrada de sustancias tóxicas y/o componentes plasmáticos de los capilares del coroides hacia la retina (Martínez-Morales y col., 2004; Runkle y Antonetti, 2011).

Las principales funciones del EPR son las siguientes:

1. Transporte de nutrientes, iones y agua. En las células del EPR se distinguen 5 mecanismos de transferencia de solutos: difusión de pequeños solutos a través del espacio paracelular existente entre la monocapa de células, difusión facilitada a favor de gradiente mediante canales dispuestos tanto en la membrana plasmática apical como basal (por ejemplo, el transportador de glucosa), transporte activo como son las bombas Na^+/K^+ -ATPasa, transcitosis (transporte mediado por vesículas) de la membrana apical a la basal y el transporte mediante modificación

- de soluto como por ejemplo, el transporte *all-trans*-retinol/11-*cis*-retinal hacía los fotorreceptores (mediado por endocitosis) (Rizzolo y col., 2011).
2. Absorción de la luz y protección frente a la fotooxidación (Wimmers y col., 2007; Kim y col., 2008). El EPR tiene tres estrategias de defensa frente a los altos niveles de estrés oxidativo que se originan en la retina como consecuencia de la exposición continuada a la luz (fotooxidación de los lípidos) y como consecuencia de la elevada cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) que se originan durante el ciclo visual. La primera, es la absorción y filtrado de la luz por parte de los fotopigmentos ej. melanina. La segunda, es la presencia de antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa y la catalasa y de antioxidantes no enzimáticos como los carotenoides. Y la tercera, el papel de la melanina y el glutatión en la defensa antioxidante (Simó y col., 2010).
 3. Reisomerización del *all-trans*-retinol a 11-*cis*-retinal, clave para el ciclo visual (Rizzolo y col., 2011). El 11-*cis*-retinal es un cromóforo que pasa del EPR a los SEF dónde, junto con una opsina, forman la rodopsina, complejo encargado de absorber un fotón de luz. Esta reacción fotosensible provoca la fotoisomerización de 11-*cis*-retinal a *all-trans*-retinal, que se separa de la opsina, se reduce a *all-trans*-retinol y es transportado al EPR donde vuelve a isomerizar en 11-*cis*-retinal. Estos cambios conformacionales es lo que se conoce como ciclo retinoide de regeneración del cromóforo 11-*cis*-retinal (Palczewski, 2011).
 4. Fagocitosis y metabolización de los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF) (Bosch y col., 1993; Wimmers y col., 2007). Al igual que el EPR, los fotorreceptores acumulan gran cantidad de productos fotooxidativos tóxicos en sus segmentos externos, como consecuencia del ciclo visual. Las células del EPR se encargan de la fagocitosis de dichos segmentos y de su metabolización en moléculas esenciales que serán enviadas a los fotorreceptores para generar nuevos SEF (Simó y col., 2010). La alteración de algunos de los pasos o componentes de la fagocitosis de los SEF puede causar diversas retinopatías (Kevany y Palczewski, 2010).
 5. Secreción de varios factores esenciales para la integridad estructural de la retina. Secreta una gran variedad de factores de crecimiento así como una serie de factores esenciales para mantener la integridad de la retina y del coroides. Por ejemplo, el factor derivado del epitelio pigmentado, PEDF, que es un modulador de la vascularización retinal postnatal o el neuroprotector frente a la apoptosis inducida por hipoxia, que es un factor antiangiogénico (Simó y col., 2010).

También se encarga de estabilizar la composición iónica del espacio subretinal, imprescindible para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores durante el ciclo visual, y contribuye a mantener un estatus inmunológico privilegiado en el ojo ya que, además de formar parte de la BHR, secreta factores inmunosupresores dentro del mismo (Simó y col., 2010).

3.4.2. Fotorreceptores

Los fotorreceptores son neuronas fotosensibles capaces de convertir la energía de la luz en energía eléctrica, mediante un proceso que se denomina fototransducción. También actúan como neuronas, liberando neurotransmisores (glutamato) en su terminal sináptico para la transmisión de la señal eléctrica a la células vecinas. Esto lo realizan mediante un tipo especial de sinapsis química denominada sinapsis en cintilla (*synapse ribbon*).

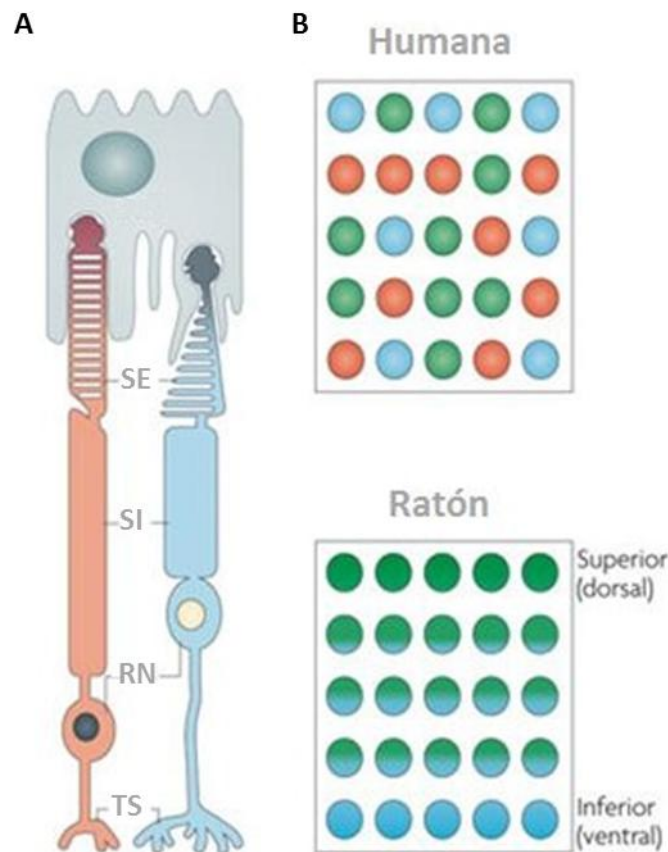


Figura 10. Morfología y distribución de los bastones y de los conos. A- Morfología de los bastones y de los conos. Segmentos externos (SE), segmentos internos (SI), región nuclear (RN) y terminales sinápticos (TS). B- Distribución de los conos en la retina de mamíferos. En humanos, los conos con opsinas L (rojos), con opsinas M (verdes) y los que tienen opsinas S (azules) siguen una distribución en mosaico. En ratones, los conos expresan opsinas M y S en gradientes opuestos de la zona dorsal/superior (opsinas M) a la ventral/inferior (opsinas S) (modificado de Swaroop y col., 2010).

Como consecuencia de estos dos mecanismos, los fotorreceptores presentan una elevada actividad metabólica, consumen una gran cantidad de oxígeno y están continuamente expuestos a fotones de luz. Todo esto provoca la generación de grandes cantidades de radicales libres, que son muy dañinos para el ADN y los discos membranosos de los fotorreceptores (Smith, 2001).

En la mayoría de los vertebrados, atendiendo a su apariencia morfológica, se distinguen dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos. Pero no sólo difieren en la estructura sino también en su grado de sensibilidad a la intensidad lumínica y longitud de onda a la que absorbe la luz, al tipo de pigmentos que contiene, al grado de saturación, a la velocidad de adaptación a la oscuridad y al tipo de conexiones en la capa plexiforme (Smith, 2001).

En la estructura general de los fotorreceptores se distinguen cuatro regiones (**Figura 10-A**) (Swaroop y col., 2010):

1. Segmento externo (SE): se dispone entre las láminas cilíndricas y microvellosidades del polo apical de las células EPR. Está formado por discos membranosos apilados, donde se localiza la maquinaria necesaria para la fototransducción. De la base del SE parte un cilio, dispuesto excéntricamente, que conecta con el segmento interno del fotorreceptor; esta región sirve para el transporte de vesículas entre ambas zonas. En la zona más distal del SE tiene lugar el desprendimiento de los discos membranosos y en la zona más próxima al segmento interno se produce la biogénesis de los discos membranosos. En los bastones, los SE (SEB) están formados por discos membranosos libres rodeados de la membrana plasmática mientras que en los conos, los SE (SEC) están constituidos por invaginaciones de la misma membrana plasmática. Por tanto, los discos de SEB se encuentran aislados del espacio extracelular por la membrana plasmática y los discos de SEC están abiertos a la matriz extracelular. Esta diferencia morfológica hace que en los SEC haya una mayor superficie continua, facilitando así, que las reacciones de la fototransducción y del metabolismo del cono sean más rápidas que en el bastón. Los SEC al ser estructuras abiertas también facilitan el tráfico de sustancias entre el cono y la matriz interfotorreceptor.
2. Segmento interno (SI): se distinguen dos zonas, una zona elipsoide externa con un gran número de mitocondrias y una zona mioide interna donde se localiza la maquinaria de síntesis proteica de la célula.
3. Región nuclear: constituida por el núcleo del fotorreceptor.
4. Terminal sináptica (TS): donde tiene lugar las conexiones sinápticas con los otros tipos celulares (**Figura 11**). La terminación sináptica del bastón, denominada esférula por su morfología redondeada, está formada por una invaginación dentro de la cual se encuentran dos prolongaciones de las células horizontales y una o varias dentritas de las células bipolares; este complejo desde el punto de vista histológico se denomina diada. El pedículo, denominación de la terminación del cono, está formado por múltiples invaginaciones donde normalmente se localizan dos prolongaciones de las células horizontales y una sola de la célula bipolar, formando una estructura que se denomina triada (**Figura 12**)(<http://webvision.umh.es>).

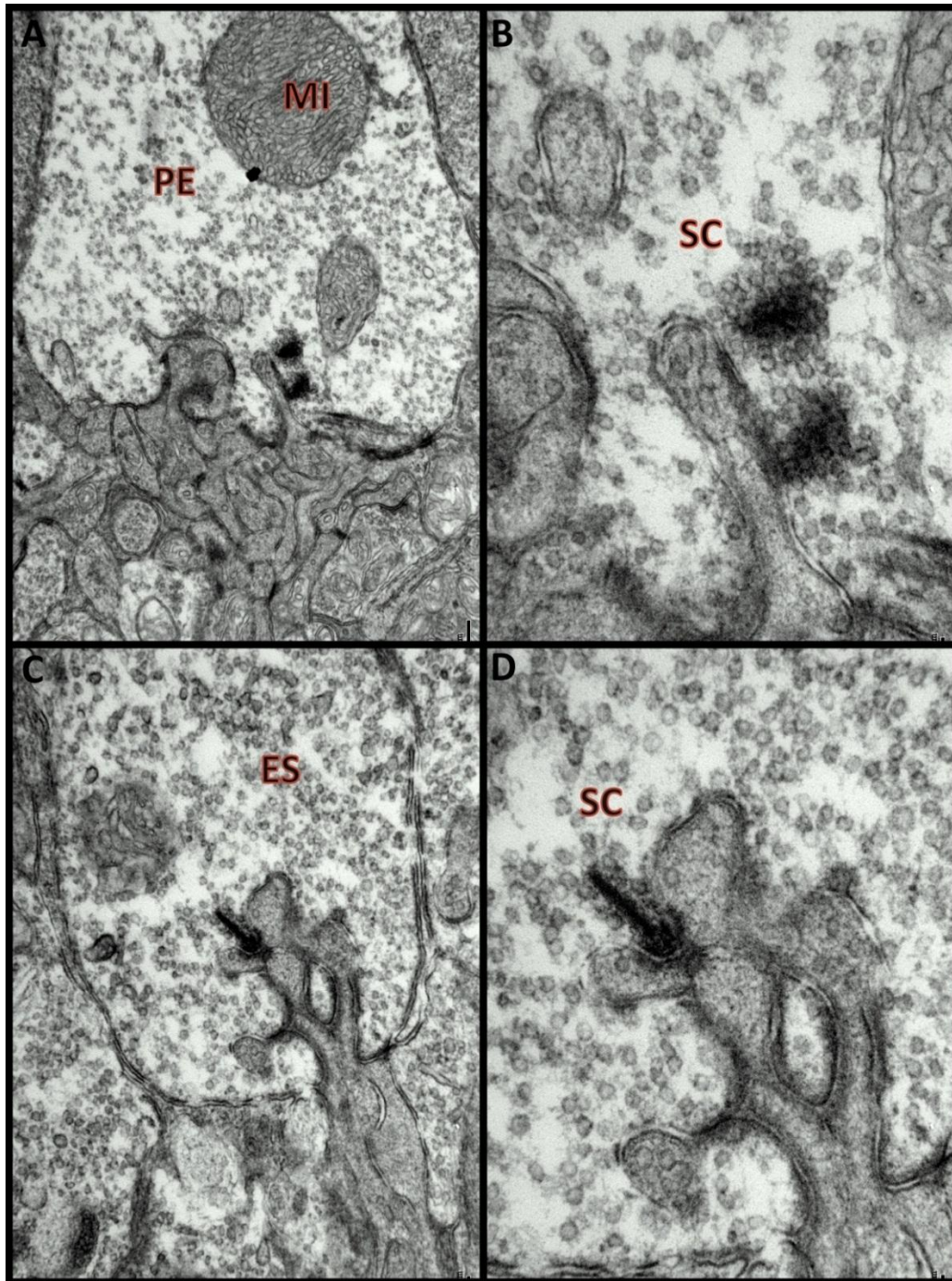


Figura 11. Micrografías de los TS de la retina de un ratón HsdWin:NMRI obtenidas durante la realización de esta tesis doctoral. A y B- pedículo (PE) de un cono, C y D- esférula (ES) de un bastón. Mitocondria (MI), sinapsis en cintilla (SC) (Zurita y Montoliu, datos no publicados).

En la terminal sináptica de los fotorreceptores se pueden distinguir tres tipos de sinapsis: las sinapsis eléctricas, las sinapsis químicas convencionales y un tipo de sinapsis química especial denominada sinapsis en cintilla (el nombre se deba a que en el terminal sináptico de dichas sinapsis se encuentra una estructura proteica denominada cintilla sináptica, alrededor de las cuales se localizan vesículas sinápticas cargadas de

neurotransmisores) (**Figura 12**). La primera tiene lugar entre fotorreceptores y las otras dos entre los fotorreceptores y las células horizontales y bipolares. (Tom Dieck y Brandstätter, 2006)(<http://webvision.umh.es>).

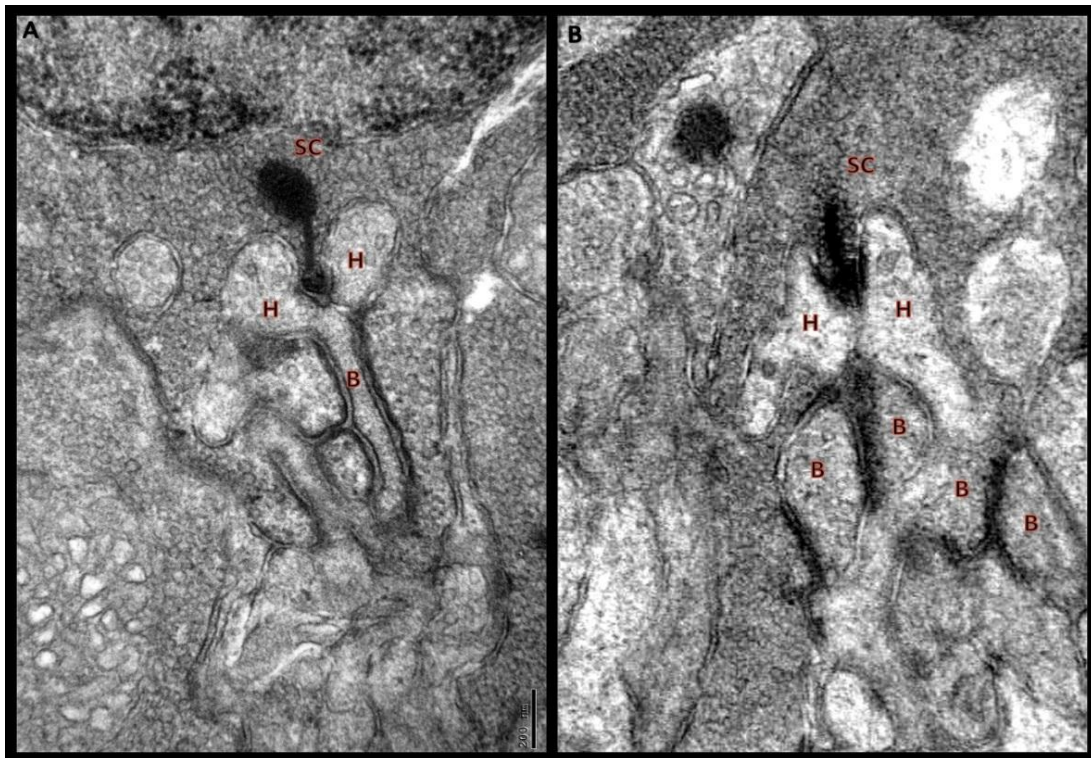


Figura 12. Micrografías de la retina de un ratón transgénico YRT2 obtenidas durante la realización de esta tesis doctoral. Terminales sinápticos de los fotorreceptores. A- diada de un bastón y B- triada de un cono. Sinapsis en cintilla (SC), dendritas células horizontales (H), dendritas células bipolares (B) (Zurita y Montoliu, datos no publicados).

Los bastones son muy sensibles a los estímulos lumínicos, son los responsables de la visión en condiciones escotópicas (baja luminosidad / visión nocturna acromática). Su respuesta a condiciones de baja luminosidad es lenta, se saturan en condiciones de luz diurna y su recuperación tras una exposición a una luz brillante es muy lenta.

Sin embargo, los conos son menos sensibles a los estímulos lumínicos y operan en condiciones fototópicas (luminosidad variable / visión diurna cromática), tienen una respuesta lumínica muy rápida, se recuperan rápidamente tras la exposición a una luz brillante y son responsables de la agudeza visual y de la percepción de los distintos colores.

La molécula encargada de capturar el fotón y por tanto de iniciar la fototransducción en los fotorreceptores es el pigmento visual; se localiza en los SE y está constituido por un cromóforo, que en la mayoría de los vertebrados es un derivado de la vitamina A (11-cis-retinal), unido covalentemente a una opsina, proteína transmembrana que varía dependiendo de la longitud de onda a la que absorba la luz.

Los bastones contienen rodopsina como pigmento visual, formado por el cromóforo 11-cis-retinal y por la opsina específica de bastones que absorbe la luz a una longitud de onda de 495 nm (Wang y Kefalov, 2011).

En cuanto a los conos, en humanos y primates diurnos, existen tres tipos (visión tricromática) dependiendo de la opsina que contengan (manteniendo el mismo cromóforo 11-cis-retinal): los de longitud de onda larga (conos rojos, contienen opsina L), los de longitud de onda media (conos verdes, contienen opsina M) y los de longitud de onda corta (conos azules, contienen opsina S) que absorben la luz a 558, 531 y 419 nm respectivamente (**figura 13**) (Haverkamp y col., 2005; Swaroop y col., 2010).

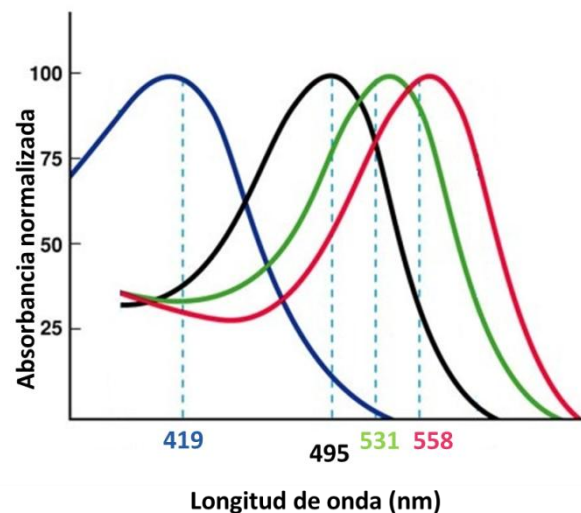


Figura 13. Espectros de absorción de los fotopigmentos.

Actualmente la teoría más aceptada para explicar el mecanismo de percepción del color es una combinación de la teoría de Young- Helmholtz(1821) y de la teoría de los procesos opuestos de Hering (1870). La teoría de Young-Helmholtz explicaría que la percepción del color se produce por tres tipos de fotorreceptores (conos L, M y S). Y la teoría de los procesos opuestos de Hering explicaría el procesamiento de la señal tricromática a través de dos canales cromáticos oponentes. Las señales transmitidas por los conos con opsinas L y M constituyen el canal cromático rojo-verde, que discrimina entre el rojo y el verde enviando la señal a las células bipolares y ganglionares enanas. Los conos con opsina S constituyen el segundo canal cromático, azul-amarillo, que opera comparando la señal de los conos azules frente a la combinación de la señal de los conos rojos y verdes. Los conos azules transmiten la señal a unas células bipolares y ganglionares específicas de ellos (**figura 14**) (Buchsbaum y Gottschalk, 1983).

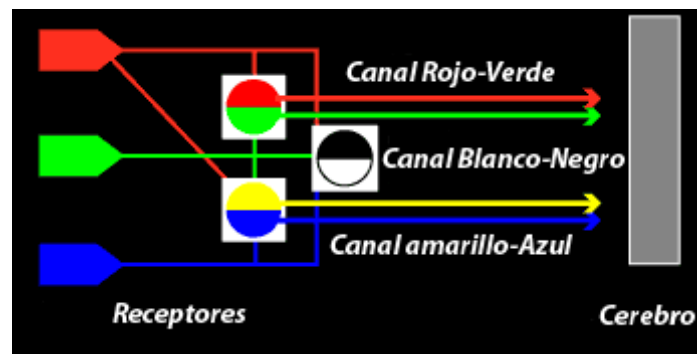


Figura 14. Canales cromáticos de procesamiento de los colores (Teoría de los procesos opuestos de Hering).

El resto de mamíferos placentarios solamente tienen dos tipos de conos (visión dicromática): los conos de longitud de onda más larga, donde el pigmento visual absorbe longitudes de onda mayores a 500 nm (conos que contienen opsinas L, M y S), y los conos de menor longitud de onda que absorben longitudes menores a 500 nm (conos que sólo contienen opsinas S). En algunos mamíferos no primates se ha demostrado que también presentan células bipolares específicas de conos S, como por ejemplo en las retinas de ratón, donde las células bipolares específicas de conos azules constituyen el 1-2% de total de células bipolares y sus dendritas sólo hacen sinapsis con los conos que sólo contengan opsina S (Haverkamp y col., 2005).

En ratones y en humanos, los fotorreceptores constituyen el 70% de las células de la retina. Hay más número de bastones que de conos, en ratones la proporción es de 30:1 y en humanos es de 18-20:1. La mayor diferencia entre una retina humana y la de un ratón es la presencia en la retina humana de una zona más delgada en la retina central donde solamente hay conos, esta región se llama fovea y es la responsable de la agudeza visual. En humanos, la densidad de los bastones se ve incrementada a medida que nos alejamos de la fovea alcanzando su máxima densidad en la región parafoveal.

Cada tipo de cono de la retina humana expresa un solo tipo de opsina (L, M o S) y se distribuyen sobre ella siguiendo un patrón en mosaico. Sin embargo, en ratones hay unos conos que sólo contienen un tipo de opsina (S) y otros que contienen las tres (L, M y S) y se distribuyen siguiendo gradientes dorso-ventrales opuestos. Es decir, los conos con sólo opsina S son más abundantes en la región ventral y van decreciendo hasta apenas aparecer en la región dorsal, y los conos con las tres opsinas a la inversa (**Figura 10-B**) (Haverkamp y col., 2005, Swaroop y col., 2010).

La gran complejidad de los fotorreceptores, su alto consumo de energía para llevar a cabo procesos tan complejos como son la fototransducción y la transmisión de la señal eléctrica (ver apartado 3.5) y la gran variedad de proteínas que intervienen en su correcto funcionamiento predisponen a estas células a padecer patologías, ambientales o genéticas, que desembocan en disfunciones visuales o en ceguera (Smith, 2000).

3.4.3. Células bipolares

Las células bipolares se extienden desde la CPE, donde sus dendritas hacen sinapsis con los terminales sinápticos de los fotorreceptores, hasta los distintos niveles de la CPI. Dependiendo del fotorreceptor con el que haga sinapsis, se distinguen dos tipos de células bipolares (**Figura 15**) (Smith, 2000; Vicente, 2009):

Las células bipolares de cono: desde el punto de vista morfológico se puede simplificar en dos tipos, las células bipolares enanas que parece que sólo hacen una sinapsis y las células bipolares en cepillo que hacen sinapsis con varios pedículos de los conos. Desde el punto de vista funcional pueden ser *ON* u *OFF*, dependiendo si son estimuladas o inhibidas por el glutamato liberado por el cono para la transmisión de la señal. De éstas la señal se transmite directamente a las células ganglionares en la CPI.

Las células bipolares de bastón: reciben los estímulos de los batones y son sólo de tipo *ON* (Wässle y Boycott, 1991; de la Villa y col., 1995), hacen sinapsis con las células amacrinas y a partir de éstas, conectan con los otros dos tipos de bipolares de cono y con las células ganglionares.

En la célula bipolar *ON*, con receptores metabotrópicos para el glutamato (de la Villa y col, 1995; Brandstätter y col, 1998), cuando hay altos niveles de glutamato (oscuridad) se activa una fosfodiesterasa que va a provocar el cierre de los canales GMPcíclico-dependientes, impidiendo la entrada de Na^+ y de Ca^{2+} y por tanto la hiperpolarización de la célula, que a su vez provoca la inhibición de la liberación del neurotransmisor glutamato por parte de la célula bipolar (**Figura 15**).

En el caso de la célula bipolar *OFF*, con receptores ionotrópicos (Wässle y Boycott, 1991; Vicente y col., 2009), los niveles altos de glutamato (liberados por los fotorreceptores en condiciones de oscuridad) provocan la abertura de los canales catiónicos, despolarizando la célula y haciendo que ella misma libere neurotransmisor (**Figura 15**).

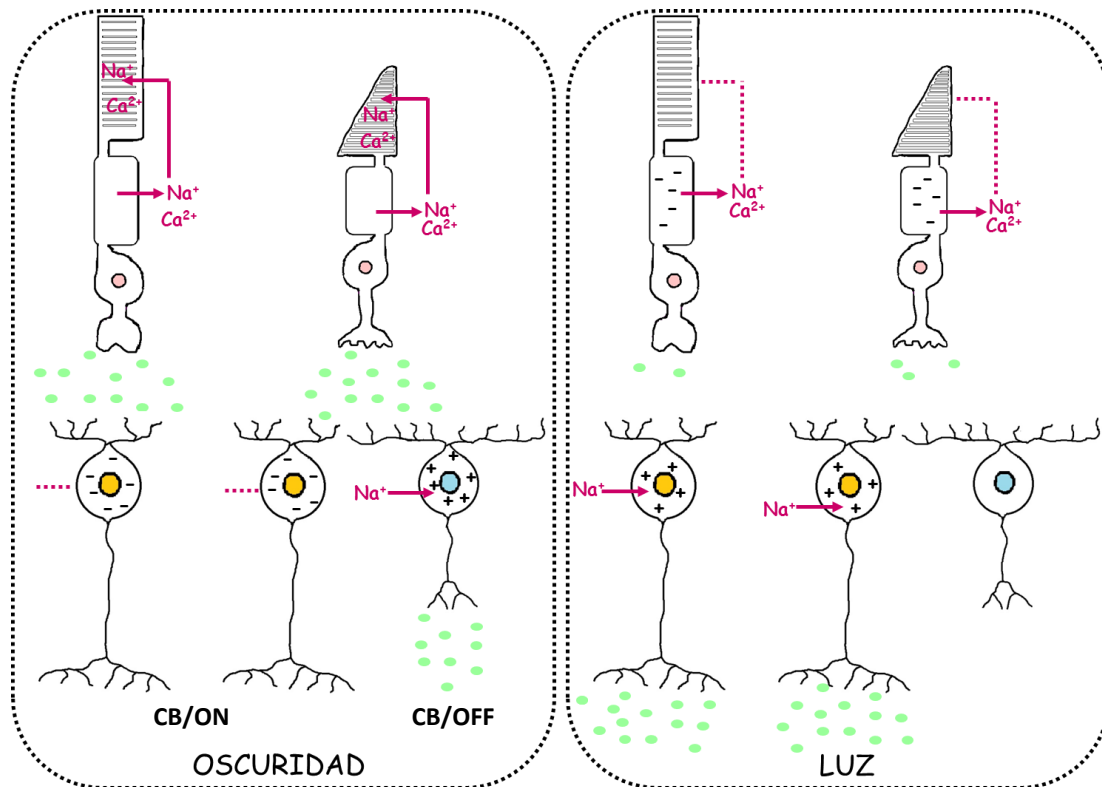


Figura 15. Mecanismo de transmisión de la señal durante la fototransducción. Conexiones entre fotorreceptores y los dos tipos de células bipolares *ON* y *OFF* (CB/ON y CB/OFF).

3.4.4. Células horizontales

Son grandes células con forma de estrella cuyas prolongaciones se extienden en el plano horizontal de la CPE, haciendo sinapsis con un gran número de terminales sinápticos de los fotorreceptores. También establecen conexiones eléctricas de tipo *gap junctions* con otras células horizontales vecinas (Smith, 2001).

La principal función conocida de estas células es la de proveer a los fotorreceptores de un mecanismo de inhibición lateral, que permita la correcta percepción de los contornos (Rodieck, 1998; Barhoum, 2006).

3.5. Fototransducción

En la retina, los fotones incidentes son convertidos por los fotorreceptores en señales nerviosas que se van transmitiendo a través de las distintas capas de la retina para salir por el nervio óptico hacia el cerebro (Wang y Kefalov, 2011).

La transducción se puede dividir en dos fases: la fase primaria, donde se produciría una reacción fotoquímica consistente en un cambio conformacional del pigmento visual (localizado en el interior de los segmentos externos de los fotorreceptores) al absorber

un fotón de luz y la fase secundaria, consistiría en una serie de procesos celulares que provocarían la hiperpolarización de los fotorreceptores.

Por tanto, la fase primaria consistiría en la absorción de los fotones por parte de los pigmentos visuales, las opsinas, las cuales están acopladas a receptores de la proteína G. El fotón isomeriza 11-cis-retinal a *all-trans*-retinal provocando un cambio estructural que activa la opsin. Y en la fase secundaria, la señal es transmitida por la activación de la transducina (proteína G) que estimula la actividad de la fosfodiesterasa y ésta a su vez reduce los niveles de GMP cíclico provocando el cierre de los canales catiónicos GMP cíclico- dependientes impidiendo la entrada de Na^+ y de Ca^{2+} (Larhammar y col., 2009) (Figura 16).

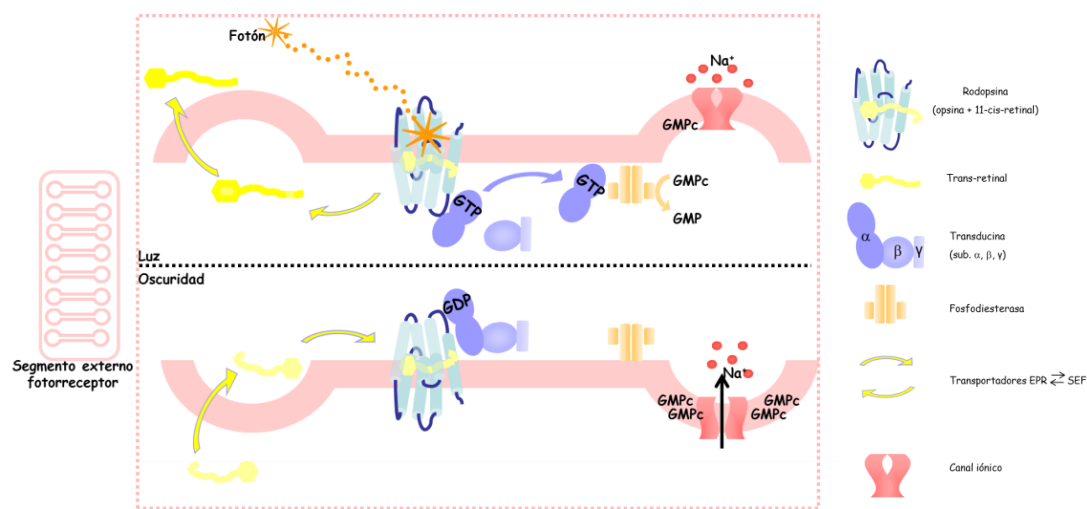


Figura 16. Mecanismo de fototransducción en vertebrados.

El GMP cíclico de los segmentos externos de los fotorreceptores se encarga de mantener abiertos los canales catiónicos GMP cíclico- dependientes; su reducción provoca el cierre de dichos canales impidiendo el retorno de Na^+ y Ca^{2+} que estaban siendo bombeados activamente desde el interior del segmento interno hacia el exterior celular. Esta situación provoca la hiperpolarización del fotorreceptor y la reducción de la liberación del neurotransmisor glutamato (produce sinapsis inhibitoria en la retina) hacia las dendritas de las células bipolares y horizontales permitiendo la transmisión de la señal (Figura 17) (Larhammar y col., 2009).

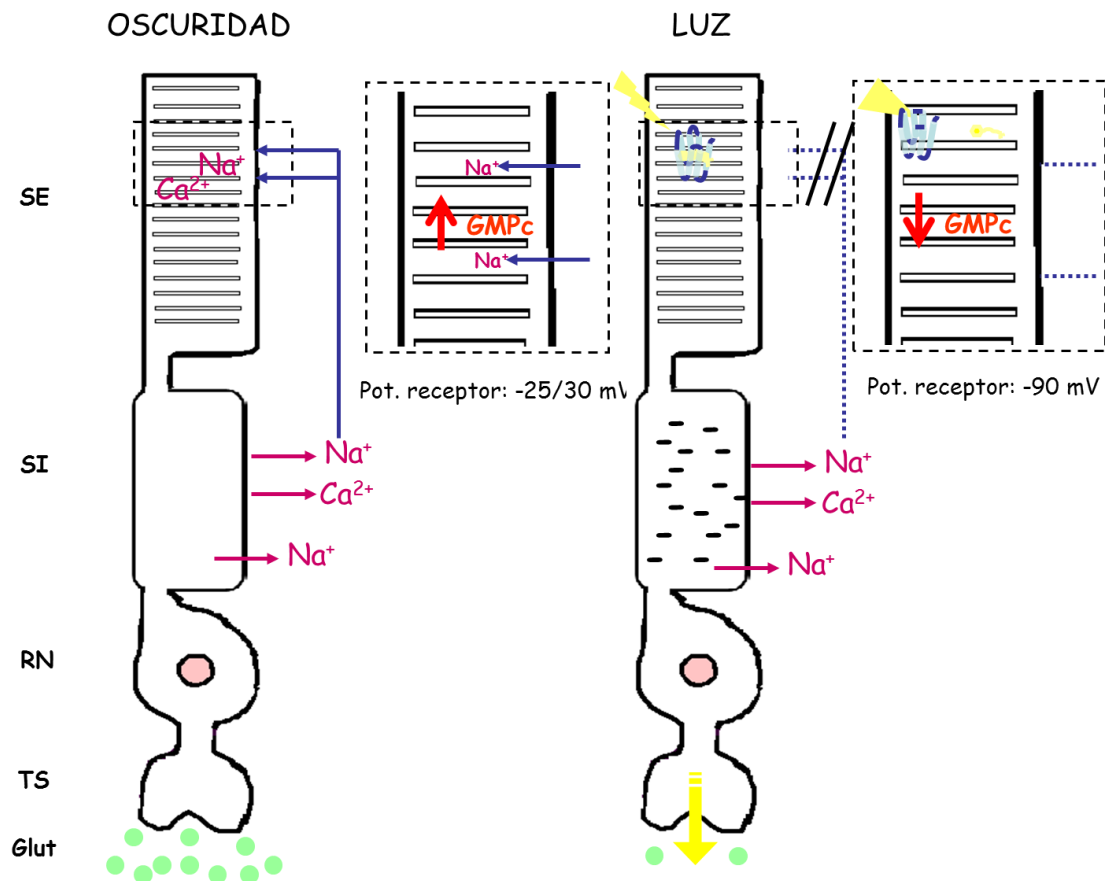


Figura 17. Hiperpolarización de los fotorreceptores durante la fototransducción. Representación de un bastón: segmento externo (SE), segmento interno (SI), región nuclear (RN), terminal sináptico (TS) y neurotransmisor glutamato (Glut).

Para que se mantenga la funcionalidad de la retina, la molécula 11-cis-retinal (11-cis-RAL), que es isomerizado a *all-trans*-retinal (*all-trans*-RAL) durante la fototransducción, debe estar continuamente en regeneración. Este proceso, denominado ciclo retinoide, en batones tiene lugar en dos sistemas celulares: los fotorreceptores y el EPR (Palczewski, 2012) y en conos en tres sistemas celulares: fotorreceptores, EPR y células de Müller (Wang y Kefalov, 2011).

El *All-trans*-RAL es reducido a *all-trans*-retinol (*all-trans*-ROL) por la retinol deshidrogenasa (RDH) en los SE de los fotorreceptores. El *All-trans*-ROL pasa al espacio interfotorreceptor donde se une a un transportador de cromóforos que lo transfiere a las interdigitaciones de las células del RPE, allí se une a otro transportador que lo dirige hacia el cuerpo de la célula del RPE dónde tiene lugar una serie de cambios conformacionales hasta obtener finalmente 11-cis-RAL. Mediante su unión a otro transportador vuelve a las interdigitaciones para a continuación pasar al espacio interfotorreceptor y de allí a los SE. En conos, además de esta vía de regeneración en RPE, *all-trans*-ROL también puede ser transportado a las células de Müller, dónde es enzimáticamente convertido en 11-cis-ROL, transferido a SI de los conos y de allí pasar

a los SE para su oxidación por una RDH (no identificada) a 11-cis-RAL (**Figura 18**) (Wang y Kefalov, 2011).

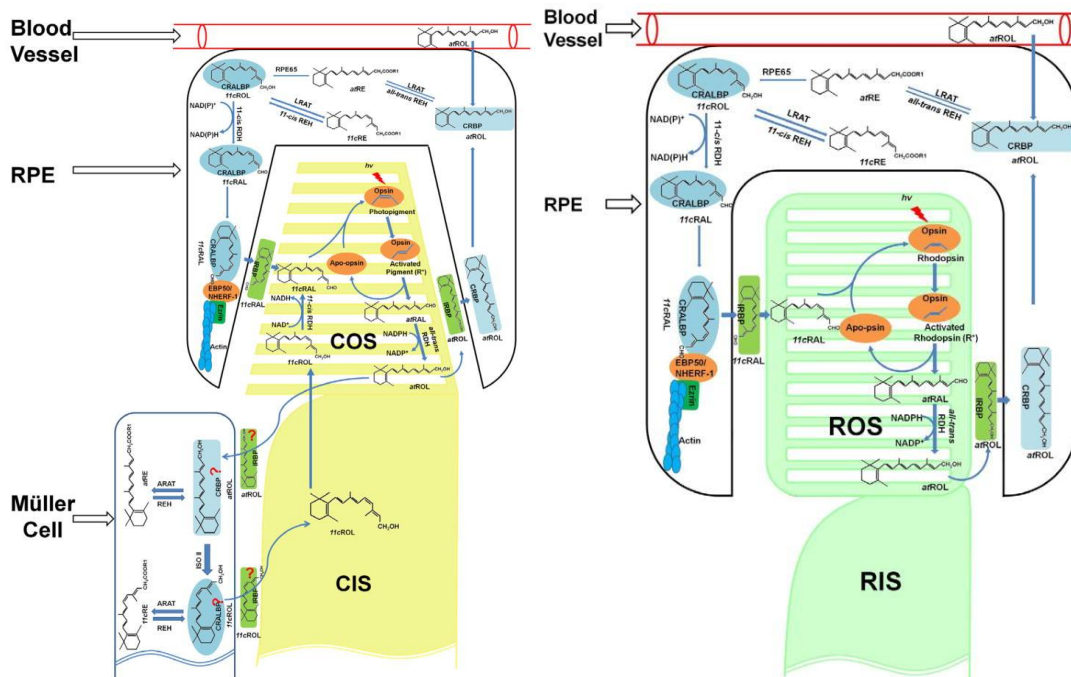


Figura 18. Ciclo retinoide en conos (izquierda) y en bastones (derecha) (Wang y Kefalov, 2011).

3.6. Estudios no invasivos de la función visual

3.6.1. Electrorretinograma

El electroretinograma (ERG) es una técnica electrofisiológica no invasiva que consiste en el registro integrado de los cambios de potencial eléctrico de la retina tras un estímulo luminoso (Vicente, 2009).

La respuesta que recoge el ERG es producida por el movimiento de iones (Na^+ y K^+) que tiene lugar en las distintas células de la retina como consecuencia de la apertura y cierre de los canales iónicos durante la transmisión de la señal lumínica. Esta actividad es medida por un electrodo de registro colocado en la superficie de la córnea y otro próximo a la órbita; conectados a un sistema de amplificación y filtrado. Adicionalmente se necesita un tercer electrodo como masa, la eliminación del ruido eléctrico (Lam, 2005).

El ERG aporta información sobre la funcionalidad de la retina. Existen muchos modelos de ERG que varían dependiendo del tipo de estímulo que se aplica a la retina, del tipo de representación de la información obtenida tras el registro y del modo de analizar los resultados.

El ERG de campo completo es el tipo de ERG que se ha utilizado para el desarrollo de los experimentos de electrofisiología de la presente tesis. Se caracteriza por la aplicación de un estímulo global de la misma intensidad lumínica sobre toda la retina.

Ante la aplicación de un estímulo luminoso de muy corta duración sobre la retina, se registran una serie de deflexiones negativas y positivas, similares tanto en animales como en humanos. Estas deflexiones se denominan onda “a” y onda “b”.

La onda “a” corresponde al cambio de potencial de membrana que tiene lugar tras la hiperpolarización de los fotorreceptores como consecuencia de la captación de los fotones de luz. Esta hiperpolarización de los fotorreceptores conlleva una disminución de la liberación del neurotransmisor, que provocará la hiperpolarización o despolarización de las células bipolares *OFF* y *ON*, respectivamente. La principal consecuencia de la despolarización de las bipolares *ON* es un aumento del K^+ extracelular, primero en CPE causando la despolarización de células de Müller, y luego en la CPI, provocado por las despolarizaciones de células amacrinas y ganglionares. Por tanto, a la formación de la onda “b” participan los incrementos de K^+ extracelular de la CPE (en mayor medida) y de la CPI (Fishman y col., 2001; Vicente, 2009).

Atendiendo a las condiciones lumínicas en las que son obtenidas las respuestas, actualmente se han establecido unos estándares de registro electrorretinográfico (**Figura 19** (Fishman y col., 2001; Lam, 2005; Vicente, 2009):

CONDICIONES ESCOTÓPICAS (oscuridad):

Sensibilidad a bastones: trazado electrorretinográfico obtenido cuando se aplica un estímulo luminoso a una intensidad que no induce la respuesta de los conos. En condiciones normales aparece una deflexión positiva (onda b) generada por las células bipolares de bastón.

Respuesta mixta máxima de conos y bastones: consiste en el registro después de un flash de luz blanca (de gran intensidad para activar conos y bastones). El resultado es una deflexión negativa (onda a) correspondiente a la activación de los fotorreceptores, seguida de una positiva (onda b) debido a la activación de las células bipolares.

Potenciales oscilatorios: son una serie de deflexiones positivas y negativas obtenidas mediante la filtración eléctrica del registro de la respuesta mixta máxima de conos y bastones. Se filtra los componentes más lentos (generados por los fotorreceptores y las células bipolares despolarizantes); quedando las deflexiones correspondientes a las células amacrinas y ganglionares.

CONDICIONES FOTOTÓPICAS (luz):

Respuesta de conos a un flash de luz: flash de luz blanca de gran intensidad. El resultado es una deflexión negativa (onda a) correspondiente a la activación eléctrica de los conos, seguida de una serie de deflexiones positivas y negativas generadas por la activación de células bipolares despolarizantes e hiperpolarizantes.

Respuesta estímulos repetidos (flicker): consiste en el trazado electroretinográfico que se registra ante una serie de flashes de luz blanca de gran intensidad. Se producen una serie de deflexiones positivas y negativas correspondientes a la respuesta de los conos y sus células postsinápticas.

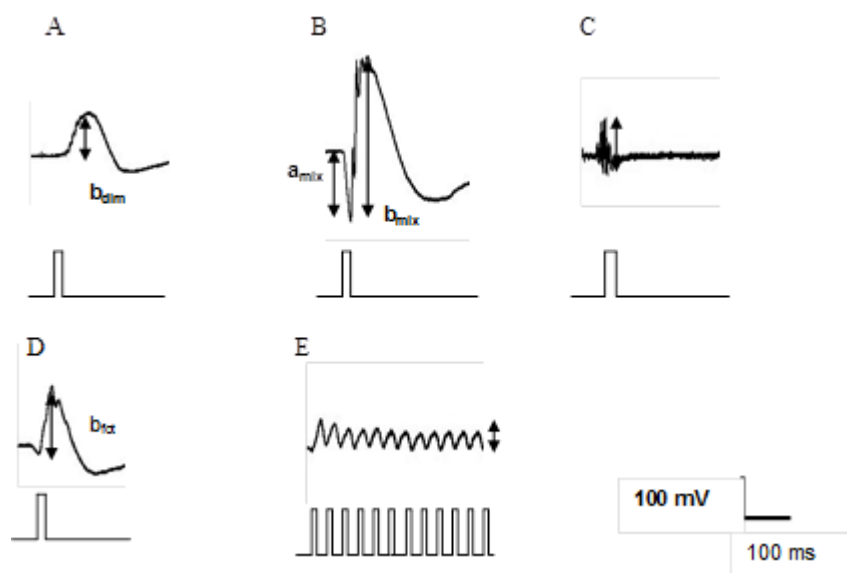


Figura 19. Respuestas electroretinográficas estándar en un ratón con visión normal. A, B, C, Respuestas electroretinográficas registradas en condiciones escotópicas. A, Respuesta de bastones, onda b. B, Respuesta mixta, ondas a y b (a_{mix} y b_{mix}). C, Potenciales Oscilatorios. D y E, Respuestas electroretinográficas registradas en condiciones fotópicas. D, Respuesta de conos, onda b fotópica (b_{fo}). E, Respuesta Flicker. Las flechas indican los valores de máxima amplitud de cada onda. Se muestra bajo cada registro, en línea fina, el estímulo aplicado (Barhoum, 2006).

3.6.2. Test optomotor

El test optomotor es un experimento de comportamiento visual ampliamente utilizado para el estudio del reflejo optocinético (movimientos que realiza el sistema visual para compensar el movimiento en la imagen cuando estamos mirando un objeto en movimiento con un patrón rápidamente repetitivo).

En ratones, el test se encarga de medir la agudeza visual y la capacidad de percibir objetos en movimiento mediante el conteo del número de “cabeceos” con respecto al número de giros del cilindro (Lavado y col., 2006; Forns, 2008). El objetivo final de este experimento es evaluar la función visual y la funcionalidad de la proyección de las células ganglionares de la retina sobre centros visuales, como puede ser el colículo superior (CS).

El instrumento de medida consta de un tambor giratorio con barras verticales blancas y negras (hay diferentes modelos con distintos tamaño de barras) capaz de girar a distintas velocidades y en distintos sentidos, y de una cámara de video encargada de registrar los movimientos del ratón (Lavado y col., 2006; Forns, 2008). Los movimientos oculares causados por el reflejo optocinético se acompañan de movimientos de la cabeza en la misma dirección si el ratón percibe adecuadamente el estímulo, es decir, si el ratón ve (Prusky y col., 2004); estos movimientos son los que se contabilizan.

El ratón se introduce dentro del cilindro, éste empieza a girar, si el ratón no tiene problemas de visión, se desplazará en la dirección de giro; estos movimientos se interpretan como cabeceos, se contabilizan y finalmente se representan en función del número de giros del cilindro (**Figura 20**) (Abdeljalil y col., 2005).



Figura 20. Instrumental necesario para medir la función visual mediante el test optomotor (prototipo diseñado por el Prof. Pedro de la Villa, Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares).

[illegible]

[REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]

[illegible]

[REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

4. MODELOS ANIMALES DE ALBINISMO

A continuación se describen los modelos de ratón utilizados en esta tesis.

La colonia de ratones HsdWin:NMRI está constituida por ratones albinos y no consanguíneos, por tanto la mayoría de sus loci se encuentran en heterocigosis segregando en la población, excepto el locus de la tirosinasa que es homocigoto mutante y portador de la mutación albina, por eso los ratones carecen de pigmento.

El uso de ratones no consanguíneos aumenta la heterogeneidad dentro de la población pudiendo interferir en los resultados experimentales. Para evitar estas interferencias se podrían haber utilizado ratones consanguíneos para los experimentos, pero el resto de cepas de ratón albinas consanguíneas tienen mutaciones en loci que afectan a la pigmentación y/o la función visual (por ejemplo, BALB/c (*Tyrp1^b*), SJL (*Pde6b^{rdt}*), FVB (*Pde6b^{rdt}*); (Gimenez y Montoliu, 2001) y por tanto no serían útiles para los estudios del sistema visual. Por otro lado, los ratones no consanguíneos se asemejan más a la población humana (heterogeneidad) por lo que se han propuesto como mejores modelos de enfermedades humanas (Chia y col., 2005; Yalcin y col., 2010).

Los ratones HsdWin:NMRI de Harlan tuvieron su origen a partir de una colonia de nueve ratones *Swiss* enviados a Estados Unidos, en 1926, por Clara Lynch desde Lausana, Suiza. En 1937 pasaron de la Dra. Lynch a Poiley; éste los estuvo cruzando entre sí (ratones NIH/PI). Hasta la F51 se mantuvieron en el instituto de investigación naval de Estados Unidos dónde se les denominaba NMRI (*Naval Medical Research Institute*). En 1958 los enviaron a Hannover, en 1981 pasaron a Winkelmann y en 1998 de Harlan Winkelmann a su enclave actual, Harlan *Laboratories*, dónde se denominan HsdWin:NMRI (Harlan Sprague-Dawley, Winkelmann).

La colonia de ratones HsdWin:NMRI son un buen modelo animal de albinismo oculocutáneo tipo I (mutación del locus c-albino) presentando una ausencia total de pigmento, además de las anomalías visuales conocidas, asociadas a albinismo, (Jeffery y col., 1994; Jeffery y col., 1997; Jeffery, 1997) y de anomalías auditivas (Murillo-Cuesta y col., 2010).

Estos defectos son completamente corregidos mediante transgénesis, al introducir una copia del gen de la tirosinasa en animales albinos (Schedl y col., 1993; Jeffery y col., 1994; Brem y col., 1996; Montoliu y col., 1996; Jeffery y col., 1997). La generación de los ratones transgénicos se hicieron con cromosomas artificiales de levadura (YACs), que al ser de gran tamaño son capaces de albergar dominios de expresión de genes completos (Schedl y col., 1993; Montoliu y col., 1996).

El ratón YRT2 se generó con un YAC de 250 Kb que incluía el locus de la tirosinasa completo (cinco exones, cuatro intrones, promotor y la región reguladora del locus (LCR)), permitiendo rescatar el fenotipo albino del ratón usado como cepa receptora (NMRI), consiguiendo un ratón transgénico, pigmentado y sin las anomalías visuales asociadas OCAI; indistinguible de un ratón pigmentado silvestre. (Schedl y col., 1993; Giraldo y col., 1999; Giménez y col., 2001)

En el ratón transgénico TyrTH se utilizó una construcción que contenía el minigen de la tirosina hidroxilasa y el promotor y la LCR de la tirosinasa. Estos ratones son fenotípicamente albinos pero tienen las anomalías visuales corregidas debido a la expresión ectópica del gen de la tirosina hidroxilasa en las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR)(Lavado y col., 2006). Este gen codifica para una enzima bioquímicamente relacionada con la tirosinasa, que cataliza la oxidación de L-tirosina a L-DOPA, consiguiendo así restituir la producción de L-DOPA en los ratones transgénicos. Esto permitió concluir que el precursor temprano de la melanina, la L-DOPA (y no el pigmento) o algunos de sus derivados metabólicos, son esenciales para el desarrollo correcto de la retina (**Figura 21**).

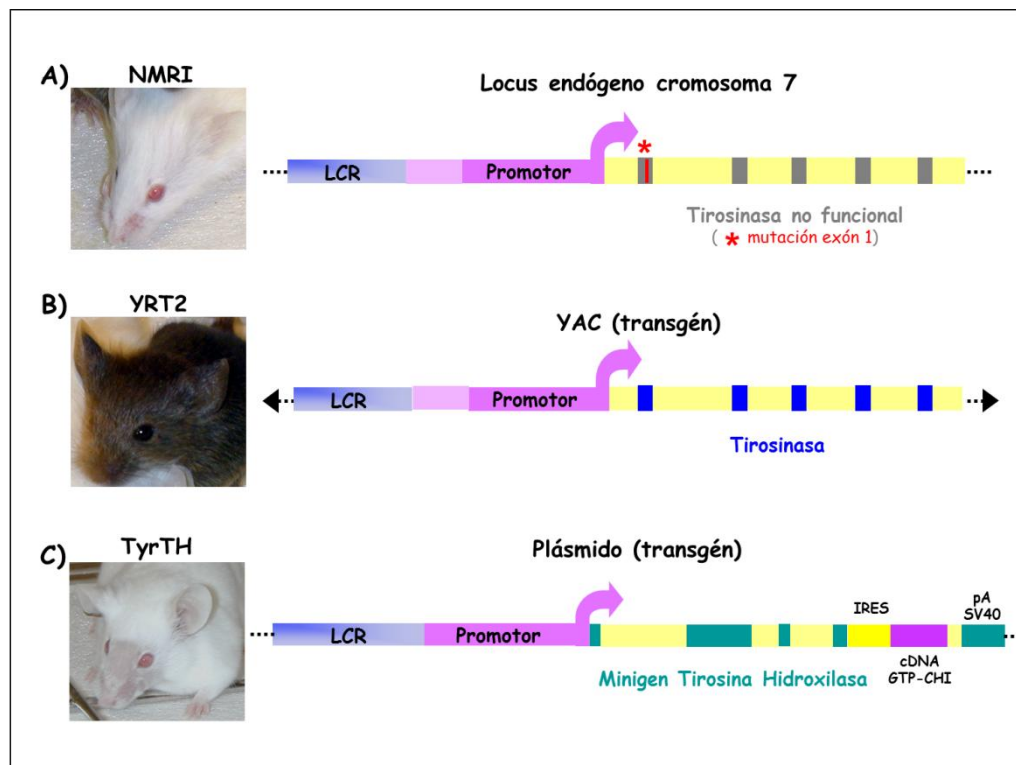


Figura 21. Representación esquemática de los transgénos o loci presentes en los modelos animales utilizados. A) Ratón no consanguíneo HsdWin:NMRI, B) Ratón transgénico YRT2 y C) Ratón transgénico TyrTH.

- I. Analizar el patrón de expresión génica, en dos estadios importantes para el desarrollo de la retina (18,5 y 21,5 d.p.c), en un modelo animal de albinismo oculocutáneo tipo I (ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI) con objeto de determinar aquellos genes que pudieran presentar perfiles alterados de expresión asociados al albinismo, en comparación con ratones transgénicos YRT2 y TyrTH, obtenidos en el mismo fondo genético, en los que las alteraciones visuales asociadas al albinismo habían sido corregidas.
- II. Estudiar la estructura y la funcionalidad de la retina de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI con respecto a los dos modelos ratones transgénicos: YRT2 y TyrTH.
- III. Identificar la mutación génica en ratones HsdWin:NMRI asociada a un fenotipo histológico degenerativo de la retina y con un patrón eletrorretinográfico alterado, con una respuesta nula a conos.

1. MANTENIMIENTO COLONIAS DE RATONES

1.1. Animalario

Los ratones se mantuvieron en los animalarios del CNB y de la Universidad de Alcalá de Henares, en jaulas con agua y comida *ad libitum*. En ambos casos se tratan de animalarios de nivel II de bioseguridad, con un ciclo nictameral controlado por luz artificial (300 lux) de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (luz de 8:00 a 20:00 h), una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa del $55\%\pm 10\%$ y aire filtrado por filtros de alta eficacia, siendo las renovaciones del aire/hora de 18, de acuerdo con la legislación vigente (Directiva Europea 86/609/CEE y con el Real Decreto 1201/2005).

Las colonias de ratones se mantuvieron con el establecimiento de cruces siguiendo los protocolos habituales. Las crías se destetaron a los 21 días después del parto. En ese momento se separaron por sexos, se identificaron con un número de 4 dígitos mediante pendiente metálico (*National Tag Co.*) y se obtuvo una biopsia de cola ($<1\text{cm}$) para su posterior procesamiento. Para el control y seguimiento de todos los ratones de la colonia se utilizó la base de datos *MyMOUSE* (Montoliu, 2003).

Todos los experimentos con animales fueron revisados y aprobados por los respectivos Comités de Ética de experimentación animal del CNB, del CSIC y de la Universidad de Alcalá de Henares.

1.2. Establecimiento de los cruces experimentales

Para la obtención de embriones/crías HsdWin:NMRI, TyrTH e YRT2 de 18.5 d.p.c (día postcoital) y 21.5 d.p.c, necesarios para el experimento con *microarrays* de Affymetrix, se programaron cuatro tipos de cruces. Un macho YRT2 con dos hembras NMRI, un macho NMRI con dos hembras YRT2, un macho TyrTH con dos hembras NMRI y un macho NMRI con dos hembras TyrTH. Todos estos cruces por cuádruplicado.

A partir del día en que se pusieron los cruces, se fue comprobando la presencia de tapón vaginal en las hembras con el fin de calcular el día de gestación de los embriones/crías. En la mañana del día que se detectó el tapón vaginal se consideró como +0.5 d.p.c; a partir de este punto se calcularon los días de gestación para la obtención de los embriones/crías de 18.5 d.p.c y 21.5 d.p.c. Se establecieron un total de 15 cruces para obtener embriones de 18.5 d.p.c y 14 cruces para la obtención de las crías a 21.5 d.p.c.

Para el estudio de un nuevo modelo de degeneración retiniana se usaron 55 ratones de la cepa HsdWin:NMRI. Se establecieron cruces teniendo en cuenta su fenotipo visual: fenotipo normal cuando los ratones presentan una respuesta electroretinográfica normal (referidos a partir de ahora como ratones normales) y fenotipo *coneless* cuando los ratones tienen una respuesta electroretinográfica deficitaria para un tipo celular de la retina, los fotorreceptores tipo cono (en esta memoria se referirá a ellos como ratones

coneless). Desde el punto de vista genético, al alelo silvestre se le denominará “A” y al alelo mutante “a”. Se diseñaron dos tipos de cruce: uno entre un animal con fenotipo normal y otro con fenotipo *coneless* y un segundo tipo de cruce entre dos animales con fenotipo *coneless*. La F1 también fue fenotipada y se establecieron nuevos cruces entre hermanos de la F1 para obtener la F2. Entre los ratones de la F0, F1 y F2 se consiguieron 151 individuos fenotipados, distribuidos en 9 pedigríes parcialmente independientes, en los que en 5 de ellos se compartía uno de los progenitores.

1.3. Genotipado

1.3.1. Extracción ADN

La extracción de ADN genómico (descrita en el libro de protocolos Montoliu, 1997) se realizó a partir de biopsias de cola de ratón, obtenidas mediante la sección por cauterización del segmento distal de la cola (menos de 1 cm). Se almacenaron hasta su procesamiento en tubos tipo Eppendorf estériles a -20° C.

Para el procesamiento del tejido, primero se procedió a la digestión de las muestras durante una noche con 750 µl de una tampón de lisis celular (100mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 8, 100mM EDTA pH8 y 1% SDS) y 80 µl proteinasa K de Merk (24568), en un baño con agitación a 56° C.

Pasadas 16-18 horas de digestión, se añadió 250 µl de NaCl saturado (6 M) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos, para posteriormente coger 750 µl del sobrenadante y pasarlo a un Eppendorf nuevo con 500 µl de Isopropanol para su precipitación.

Seguidamente se mezcló por inversión hasta la aparición de las hebras de ADN y se centrifugó otros 10 minutos a 14.000 rpm para conseguir la precipitación de las mismas. Se aspiró el sobrenadante y se procedió al lavado del precipitado con 500 µl de etanol al 70% y con una nueva centrifugación de 10 minutos, se aspiró el etanol y se dejó secar parcialmente el precipitado de ADN.

Finalmente se disolvió el ADN en un volumen de entre 100 a 300 µl de TE pH 7.5 (10mM Tris-HCl pH 7.5 y 1mM EDTA) o agua *MilliQ*, dependiendo de su uso posterior.

Todos los ADN se conservaron a 4° C.

1.3.2. Cuantificación ADN

La cuantificación del ADN se llevó a cabo con un espectrofotómetro miniaturizado Nanodrop (Nanodrop ND-1000), basado en la medida espectrofotométrica de la absorbancia del ADN a una longitud de onda de 260 nm.

1.3.3. PCR

El genotipado de los ratones transgénicos TyrTH se basó en la determinación por PCR (siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa) de la presencia del transgén TyrTH en el ADN genómico de ratón (Lavado y col., 2006).

La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µl, contenía 2.5 µl de tampón de PCR 10x (Roche), 2.5 µl de dNTPs 10x, 0.125 µl del cebador TyrTH1 100 µM (GCT TAG TGT AAA ACA GGC TGA GAG TAT TTG), 0.125 µl del cebador TyrTH2 100 µM (AAG GGA GCA GAT GAG TAG GGA GGG C), 0.25 µl Taq-polimerasa (5 u/µl, Roche), 18 µl de agua *MilliQ* estéril, 0.5 µl de MgCl₂ (Roche) y 0.5 µl de la solución de ADN. Ambos cebadores servían para detectar un producto final de 600 pb.

La amplificación se llevó a cabo en tubos de 0.2 ml de tapa plana (MJ Research) en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) con el siguiente programa: 4 minutos a 94° C, 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 68° C (por 30 ciclos), 1 minuto a 72° C y 10 minutos a 72° C.

1.3.4. Electroforesis de ADN

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa (Sea-Kem LE agarosa, LONZA) preparados al porcentaje necesario según el tamaño de la banda (entre 0,8 y 1,5%) con Bromuro de Etidio 0.5 µg/ml (Sigma) en tampón TAE 1x(Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8) aplicando una diferencia de potencial eléctrico de un máximo de 5V/cm en cubetas de 17x8 cm ó 17x16 cm (Ecogen) utilizando una fuente de alimentación capaz de alcanzar 200V-200mA (Segainvex).

Para cargar los geles se usó tampón de carga 6x (0,25% *Bromphenol blue*, Sigma, 0,25% *Xilene cyanole FF*, Sigma, 50 mM EDTA pH8, Calbiochem y 30% Glicerol al 87%, Merck) y como marcadores de peso molecular *Ready-Load 1Kb Plus DNA* o 25 bp ADN *ladder* (Invitrogen), dependiendo del tamaño de la banda del producto de PCR.

1.3.5. SLOT BLOT

Otro método que se usó para confirmar la presencia del transgén TyrTH en el ADN genómico de ratón fue mediante SLOT BLOT (**Figura 22**).

Primero se homogeneizaron las soluciones de ADN en un bloque térmico con agitación a 65° C. Se mezcló por agitación 15 µl de las muestras ADN con 500 µl de una solución desnaturizante (0.4 N de NaOH y 0.5 M EDTA pH8 en agua *milliQ*) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos; luego se pasaron a hielo hasta que se cargaron en los pocillos del MINIFOLD II (*Shleicher & Schuell*).



Figura 22. SLOT BLOT, MINIFOLD II (*Shleicher & Schuell*).

Siguiendo el protocolo del fabricante se montó el *SLOT BLOT*, el cuál contenía una membrana hybond-N (con carga positiva) (*code RPN 203 N, batch 06F059, version LRPNN/95/10*, Amersham Biosciences), donde se quedaron pegados los ADNs (con carga negativa) mediante la aplicación de vacío.

A continuación se fijó el ADN en la membrana con dos pulsos de 70.000 mJ/cm² de luz ultravioleta con un *UV Crosslinker (CL- 1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP)*.

La membrana con el ADN fijado se prehibridó en un horno de hibridación con rotor giratorio a 65° C (Amersham) durante 10 minutos con un tampón de membranas (25 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA) y 15 ml de una solución de hibridación (0.25 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 7 % SDS y 1 % BSA).

Por otro lado, se marcó la sonda SV40 (10ng/μl) mediante *random priming* con α-³²P-Dctp 3000 Ci/mmol utilizando el *kit High Prime* (Roche) y se purificó con columnas G-50 (*probetQuant, microcolumns, Gehealthcare*).

Se añadió la sonda marcada, previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 96° C, en los tubos de hibridación con las membranas prehibridadas y se dejó en un horno de hibridación unas 16-18 horas a 65° C girando a máxima velocidad (65 *strokes/min*).

Tras las 18 horas de hibridación con la sonda, las membranas se lavaron en una solución que contenía 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1% SDS, 1 mM EDTA pH 8 precalentada a 65° C para quitar el exceso de radiactividad. El primer lavado fue de 5 minutos y los otros tres restantes fueron de 15 minutos. Todos los lavados se hicieron en un horno de hibridación, a 65° C y a máxima velocidad de giro excepto el último que se hizo en un recipiente de plástico, en un baño de agua termostatzada con agitación.

Las membranas se expusieron 48 horas a temperatura ambiente en unos *cassettes* específicos para el revelado en *PhosphorImager* (Molecular Dynamics) y las imágenes resultantes se procesaron con el programa **IQMac v1.2**.

2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN VISUAL DE LOS RATONES

En el laboratorio de electrofisiología visual del Prof. Pedro de la Villa (Universidad de Alcalá de Henares) se midió la funcionalidad de la retina de los ratones NMRI, TyrTH e YRT2, mediante dos técnicas no invasivas: el electrorretinograma (ERG) de campo completo estándar y el test optomotor.

Los equipos utilizados para la realización de estas técnicas siguen las indicaciones de la Sociedad Internacional para la Electrofisiología Clínica de la Visión (*Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, ISCEV).

2.1. Electrorretinograma de campo completo

El equipo utilizado para la realización de los electrorretinogramas (Barhoum, 2006; Vicente, 2009) consta de:

Dos fuentes de iluminación: una campana *Ganzfeld* para la aplicación de estímulos de baja intensidad y una fuente de diodo de emisión de luz (LED, *Light Emission Diode*) para la iluminación homogénea de toda la retina.

Un fotómetro para medir las intensidades lumínicas utilizadas en cada registro (*Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg, GE*).

Una caja de Faraday donde se coloca el animal anestesiado durante el registro para anular las interferencias debidas a campos magnéticos externos.

Una manta calefactora para mantener la temperatura corporal a 37°C durante el registro.

Tres electrodos: un electrodo de tierra que se coloca subcutáneamente en la cola del animal, un electrodo de referencia en forma de lengüeta que se introduce en la boca del animal y un electrodo corneal con forma de lente de contacto que se dispone en el eje visual y a 1 mm aproximadamente de la córnea

Equipo de registro: un ordenador desde donde se controla y emite el protocolo de estimulación, una tarjeta digitalizadora (*Power Lab, ADInstruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido*) que pasa la señal a un alimentador que permite a su vez el encendido de las diferentes fuentes de luz. Y por otro lado, un amplificador (*CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA*) que recoge y amplifica el estímulo captado por los electrodos, lo devuelve a la tarjeta digitalizadora donde se convierte la información para su representación digital en el ordenador mediante el uso del software comercial Scope v6.4 de Power Lab (*AD Instruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido*).

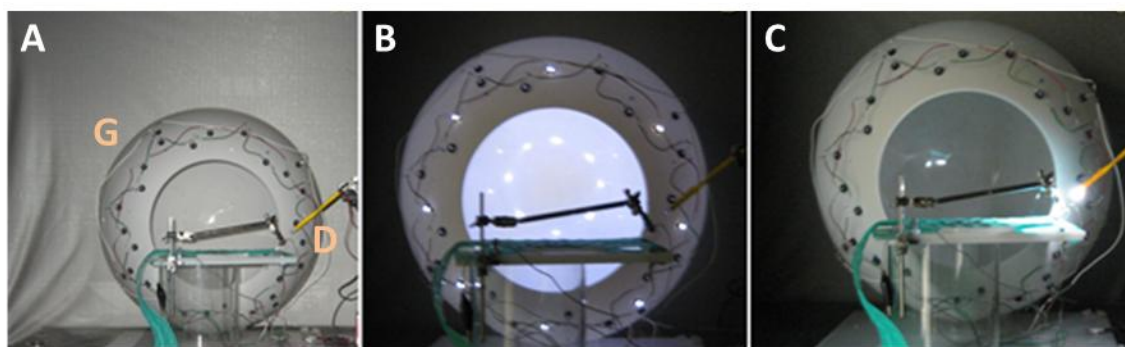


Figura 23. Elementos del equipo de Electrorretinografía. A- Campana de *Ganzfeld* (G) y fuente de diodo de emisión de luz (D). B- Campana de *Ganzfeld* encendida, C- Fuente de diodo encendida (modificada de Vicente, 2009).

Con el fin de reducir el sufrimiento animal y facilitar el registro electrorretinográfico, se anestesió a cada ratón con una inyección intraperitoneal de una solución de ketamina (95 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). El animal una vez anestesiado se dispuso dentro de una caja de Faraday, sobre una manta calefactora para a continuación prepararlo para el registro.

Se aplicó ectópicamente, a ambos ojos, una gota de Tropicamida al 1% (Culircusí Tropicamida, Alcon Cusí, Barcelona) para dilatar la pupila y otra gota de Methocel al 2% (Ciba Vision, Hettingen, Switzerland) para evitar la desecación de la superficie corneal. Seguidamente se procedió a la colocación de los tres electrodos, uno en la cola, otro en la boca y el tercero en la superficie corneal del animal.

Las repuestas electrorretinográficas inducidas por un flash/destello de luz con un estimulador Ganzfeld, cuya intensidad fue medida con un fotómetro (*Mavo Monitor USE, Gossen*; Nürenberg, Alemania) a la altura del ojo, fueron amplificadas y filtradas entre 0,3 y 1000 Hz con un amplificador Grass (*CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA*). Las señales eléctricas son digitalizadas a 20 kHz con un *Power Lab data acquisition board* (*AD instruments, Chalgrove, UK*).

Para la realización de los ERGs, previamente se mantuvieron los ratones en oscuridad durante unas 8 horas. Los ratones se prepararon para el registro con una luz roja tenue, que seguidamente se apagó para proceder con los registros en condiciones escotópicas. Para los registros en condiciones fototópicas los ratones fueron sometidos a 5 minutos de adaptación a una luz de fondo para saturar la respuesta de los bastones y poder registrar únicamente la respuesta de los conos (Barhoum, 2006; Marchena y col., 2011).

El promedio de flashes de luz oscilaba entre 4-64 estímulos consecutivos, el intervalo entre un flash y otro es de 10 segundos en condiciones escotópicas y con el flash de luz de menor intensidad y de 60 segundos para el de mayor intensidad y en condiciones fototópicas es de 1 segundo. Los distintos registros se hicieron como se indica en la **Tabla III** (Marchena y col., 2011).

Registro	Intensidad estímulo lumínico
Sensibilidad a bastones	$-2 \log \text{cd s m}^{-2}$
Mixta conos y bastones	$0,48 \log \text{cd s m}^{-2}$
Potenciales oscilatorios (filtrado 100-10.000 Hz)	$0,48 \log \text{cd s m}^{-2}$
Conos a un flash de luz	$1,48 \log \text{cd s m}^{-2}$, saturación bastones 30cd m^{-2}
Estímulos repetidos (20 Hz)	$1,48 \log \text{cd s m}^{-2}$, saturación bastones 30cd m^{-2}

Tabla III. Intensidades lumínicas para cada tipo de registro electroretinográfico.

Todos las medidas de las amplitudes de los ERGs son finalmente promediadas y analizadas estadísticamente (test *Two-way* ANOVA) usando *GraphPad Prism version 3.00* para Windows (*Graph Pad Software*, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.2. Test optomotor

El equipo con el que se llevó a cabo el test optomotor (Abdeljalil y col., 2005; Lavado y col., 2006; Forns, 2008) estaba formado por un tambor giratorio conectado a un rotor (*LKB Bromma*, Suecia) con la posibilidad de girar a distintas velocidades. La pared interna del tambor se forró con paneles con distintos patrones de bandas verticales blancas y negras. Dentro del tambor se situó un cilindro transparente donde se colocaba el ratón. 16 LEDs que iluminaban el tambor desde arriba junto con una cámara digital para la monitorización y grabación de los movimientos de los ratones.

Tras un periodo de adaptación al entorno se procedió a medir la respuesta conductual consistente en contabilizar los desplazamientos de la cabeza en el sentido de rotación del tambor (Forns, 2008).

Para minimizar la habituación de los ratones al test, se cambiaban las direcciones de giro al azar. Se establecieron cuatro velocidades angulares del tambor en ciclos por segundo, siendo un ciclo el cambio de contraste (de negro a blanco y de blanco a negro): 0.15, 0.25, 0.33 y 0.50 ciclos/segundo. La duración de cada test fue de 5 minutos.

Se cuantificaron los giros de cabeza que realizaba el ratón en cada velocidad, contabilizando como positivo el giro de cabeza que coincidía con el paso de un ciclo por delante del campo visual del ratón, en el mismo sentido que el giro de cabeza.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza Kruskal-Wallis (test ANOVA) con un nivel de significancia del 5% (Lavado y col., 2006; Forns, 2008).

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE LA ULTRAESTRUCTURA

3.1. Obtención y fijación del material biológico

3.1.1. Ojos de ratón adulto

La recolección de ojos de ratones adultos para los estudios histológicos se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos por Giménez y col., 2001. Los ratones se fijaron mediante perfusión intracardiaca con 20 ml de paraformaldehído (Merck) al 4% en PBS, para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos y con 20 ml de una mezcla de dos fijadores también en PBS (2% paraformaldehído y 2% glutaraldehído (CalbioChem), para los estudios de microscopía electrónica.

Antes de comenzar con la fijación, el animal se anestesió irreversiblemente introduciéndolo en una cámara de CO₂ durante 2-3 minutos. A continuación, se procedió a su preparación para la cirugía colocándolo en posición decúbito supino, sujetando las extremidades con cinta adherente y limpiando el tórax y abdomen con etanol al 70%. Se hizo un primer corte vertical en la piel con unas tijeras, a la altura del tórax dejando expuesta la caja torácica. Siguiendo la línea del esternón se abrió el lado izquierdo de las costillas, dejando al descubierto el corazón. Con unas pinzas se rasgó la aurícula derecha y utilizando una jeringa de 20 ml con una aguja de 25G (Becton Dickinson) se inyectó la solución fijadora en el ventrículo izquierdo, lentamente y a velocidad constante.

A medida que la sangre del animal se sustituía por el fijador se observó la progresiva decoloración del hígado y la adquisición de rigidez del cuerpo.

Una vez fijado el ratón se extrajeron los ojos con unas pinzas de punta curva, se pasaron a un tubo de 25 ml con el mismo tipo de fijador y se mantuvieron a 4°C durante 24 horas.

Pasado el tiempo de fijación se procedió a la extracción del cristalino para evitar roturas de la retina al hacer los cortes histológicos. Se sumergió el ojo fijado en una placa de 60x15 mm con PBS y con la ayuda de una lupa binocular (Leica MZ8), pinzas de disección, aguja de 25G y unas tijeras de precisión se procedió a su manipulación. Primero, se retiraron las capas de conjuntivo y restos del nervio óptico que envolvían el globo ocular. A continuación con ayuda de una aguja se hizo una punción en algún punto de la línea de unión entre el iris y la coroides, la *ora serrata*; esto permitió usar las tijeras de precisión para separar la parte anterior del ojo (iris y córnea) de la parte posterior o copa óptica (coroides y retina).

Las copas ópticas se conservan en tubos Eppendorf con PBS (tampón fosfato salino) a 4°C para su posterior procesamiento.

3.1.2. Cabezas de embriones de ratón

Los estudios en retinas de ratones en desarrollo (18,5 d.p.c y 21,5 d.p.c) se hicieron con cortes histológicos de las cabezas de los embriones y de las crías.

La obtención de los embriones de 18,5 d.p.c. se realizó por cesárea de las hembras gestantes. Cada hembra se sacrificó por dislocación cervical y se la colocó decúbito supino en la mesa de disección. Después de fijar las extremidades con cinta adherente se limpió la zona abdominal con etanol al 70% y a seguidamente se procedió a hacer tres cortes a nivel de la piel y del peritoneo, uno longitudinal siguiendo la línea media del abdomen y dos transversales a ambos lados y en la parte inferior de esa línea media, dejando la cavidad abdominal expuesta. Para acceder a los embriones se rasgó la membrana de ambos cuernos uterinos comenzando por el cérvix y finalmente la separación de los embriones de la placenta se hizo cortando el cordón umbilical.

A las crías de 21.5 d.p.c, ya nacidas, se las separó de la hembra.

Todos ellos se sacrificaron por decapitación tras una breve exposición al frío (sobre hielo) para anestesiarlos. Las cabezas se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 48 horas a 4°C (haciendo un par de cambios de fijador). Luego se pasaron a PBS y se guardaron a 4° C hasta su procesamiento.

3.2. Histología

3.2.1. Procesamiento para montaje en historesina

Para obtener cortes de retina de alta resolución para microscopía óptica, las copas ópticas se incluyeron en historesina, basándose en protocolos ya descritos por Giménez y col. (2001) con algunas modificaciones.

La retina contiene gran cantidad de estructuras membranosas muy frágiles, como por ejemplo los segmentos externos de los fotorreceptores, que requieren de un procesamiento histológico específico. Por este motivo antes de comenzar con la inclusión se tuvo que incubar la copa óptica fijada (ver apartado 3.1.1.) con tetróxido de osmio al 1% en PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se procedió a hacer varios lavados en PBS y a comenzar con el protocolo de inclusión en historesina. Se comenzó con la deshidratación de las muestras con varios lavados en distintos etanoles: dos lavados de 30 minutos en etanol al 50%, un lavado en etanol al 70% durante 24 horas y un lavado en etanol al 95% durante 1 hora. Luego se sumergieron en solución de pre-infiltración (Historesina, Leica) durante 12-14 horas a 4° C y finalmente se embebieron en medio de inclusión en un molde preparado para ello.

Se hicieron cortes histológicos horizontales con un microtomo motorizado (Leica RM 2155) a 2 µm de grosor y se recogieron en portaobjetos *SuperFrost Ultra Plus* (Menzel-Glaser).

3.2.2. Tinción con Cresil Violeta

Los portaobjetos con los cortes de historesina se introdujeron en el agente de tinción Cresil Violeta (0,1 g en 100 ml de agua destilada) durante 20 segundos, a continuación se lavaron con agua destilada durante 20 segundos y se secaron con papel absorbente. Se dejaron secar 15 minutos en una estufa a 50° C y finalmente se montaron con medio de montaje hidrófobo *Eukitt* (Sigma) y cubreobjetos de 24x60mm (Menzel-Glaser).

3.3. Inmunohistoquímica

3.3.1. *Whole mount* (neurorretinas enteras)

Con las copas ópticas fijadas con 4% de paraformaldehído se procedió a la extracción de las neurorretinas bajo una lupa binocular. De la copa óptica se separó, con ayuda de unas pinzas, la neurorretina (capa más interna) del epitelio pigmentado y resto de capas del ojo. Por la parte posterior, la neurorretina está fijada al nervio óptico, para su separación se tuvo que hacer un corte del mismo introduciendo las tijeras de precisión entre la capa de la neurorretina y el resto de las capas de la copa. Con la copa de la neurorretina extraída se procedió a hacer tres o cuatro cortes ortogonales, con las tijeras de precisión, con el objetivo de poder dejar la capa extendida (**Figura 24**).

Se conservaron en suspensión, en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunclon), con PBS y a 4°C.

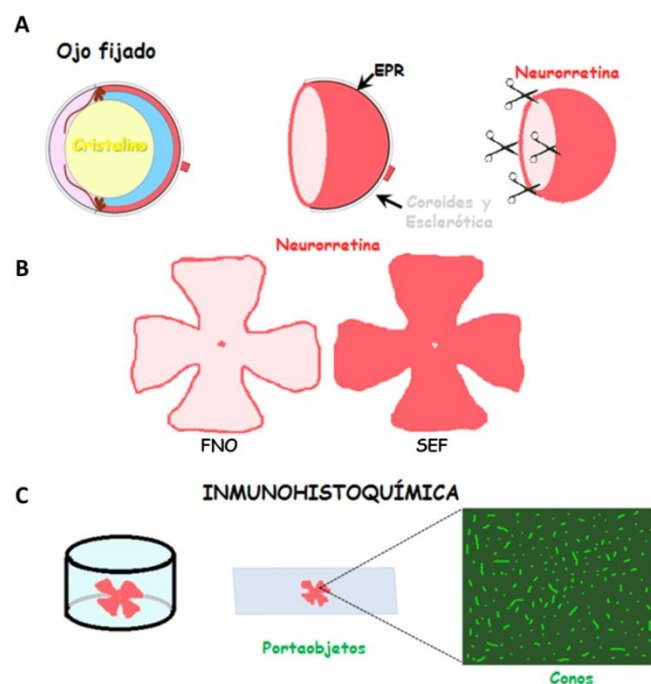


Figura 24. Esquema del procesamiento de neurorretinas enteras. **A-** Extracción neurorretina. **B-** Neurorretina extendida, lado de la capa de las fibras del nervio óptico (FNO) y cara de los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF). **C-** Esquematización inmunohistoquímica de marcaje específico de conos.

3.3.1.1. Tinción de los conos de las neurorretinas con lectina.

El marcaje de los conos con *lectina-PNA-Alexa Fluor 488* (Invitrogen), fluorocromo que se une específicamente a los segmentos externos de los conos, se inicia con las neurorretinas fijadas (**Figura 24**) (ver apartado 3.3.1.).

Todo el protocolo de marcaje se llevó a cabo con las neurorretinas en suspensión en placas de 96 pocillos y a temperatura ambiente.

Las neurorretinas estaban conservadas en PBS, por tanto lo primero que se hizo fue aspirar la mayor parte del tampón fosfato con una pipeta automática, apoyando la punta en las paredes para evitar el deterioro del tejido.

A continuación, se hicieron varias incubaciones: una primera de 15 minutos con una mezcla de 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 0,1% BSA (albúmina de suero bovino) en PBS, otra de 5 minutos con el mismo tampón pero sin BSA y finalmente otra de 2 horas con una dilución 1:500 de la lectina en PBS con 0,1% BSA y protegida de la luz. Tras la incubación con el fluorocromo, tres lavados de 5 minutos cada uno con el tampón sin BSA y protegido de la luz.

Se montaron las neurorretinas en medio de montaje hidrosoluble *ProLong* (Invitrogen), con los segmentos externos de los fotorreceptores hacía arriba, en portaobjetos y con cubreobjetos de 22x22mm. Las preparaciones se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente. La conservación de las muestras con lectina fue a 4° C.

3.3.1.2. Marcaje específico de fotorreceptores: conos verdes y azules

Para el marcaje específico de los dos tipos de conos presentes en las retinas de los ratones se usaron dos tipos de anticuerpos primarios: uno que reconocía la L-M-opsina de los conos verdes (*Rabbit anti-opsin, red/green polyclonal antibody* de Chemicon International Temecula, CA) y otro que reconocía la S-opsina de los conos azules (*Goat anti-opsin, blue polyclonal antibody* de Santa Cruz Biotechnology). Y dos anticuerpos secundarios que reconocían a sus respectivos primarios: uno contra el primario de los conos verdes (*Donkey α Rabbit Alexa 594*, Invitrogen) que emitía fluorescencia en el rojo y otro contra el anticuerpo primario que marcaba los conos azules (*Donkey α Goat Alexa 488*, Invitrogen) cuya fluorescencia se emitía en la franja del verde (Vugler y col., 2007).

El protocolo inmunohistoquímico comenzó con la aspiración (pipeta automática) del PBS, donde se encontraban las neurorretinas fijadas en suspensión (ver apartado 3.3.1.), la fijación con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos, un primer lavado con PBS y una incubación de 30 minutos con 100mM de glicina (Merck) en PBS.

Acto seguido, se hizo un lavado de 5 minutos en PBT (0,1% Igepal, CA-630 Sigma-Aldrich en PBS), se permeabilizó el tejido con 0,1% de Tx-100 (t-octilfenoxipoli-etoxietanol, Sigma) en PBS durante 15 minutos y tras un nuevo lavado de 5 minutos en PBT se bloqueó la actividad de las proteínas circulantes con una mezcla de 10% de suero

fetal bovino (Midimed) y 0,1% Tx-100 en PBS durante 1 hora (atemperando el suero a 30° C).

A continuación se pasó a la incubación de los anticuerpos primarios durante una noche a 4°C y a la de los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente (las preparaciones protegidas de la luz a partir de la incubación con el primer anticuerpo secundario). Primero se incubó con el anticuerpo primario de los conos verdes, a una dilución 1:300 en tampón para anticuerpos (2% FCS y 0,1% Tx-100 en PBS) y, después de una noche y 3 lavados en PBT de 5 minutos, con su anticuerpo secundario a una dilución 1:500 en el mismo tampón. Tras 3 lavados en PBT de 5 minutos se procedió del mismo modo con el anticuerpo primario para los conos azules (dilución 1:500) y su anticuerpo secundario (dilución 1:500).

Finalmente, después de 3 lavados en PBT de 5 minutos, se procedió al montaje de las neurorretinas en portaobjetos (*SuperFrost Ultra Plus*, Menzel-Glaser) con *ProLong* (*Invitrogen*) y cubreobjetos de 22x22mm (teniendo en cuenta que los segmentos externos de los fotorreceptores quedaran hacía arriba).

Las preparaciones se dejaron secar una noche a temperatura ambiente y se guardaron protegidas de la luz y a 4°C.

3.3.2. Secciones horizontales de retinas en desarrollo y adultas

Los estudios inmunohistoquímicos de las distintas capas de la retina se hicieron con cortes horizontales de criostato de retinas adultas y en desarrollo siguiendo protocolos ya descritos (Giménez y col., 2001,2003 y 2005). Con los tejidos fijados (ver apartado 3.3.1.) y para evitar la formación de cristales de hielo que producirían el deterioro del tejido, se procedió a equilibrar las muestras en una solución de sacarosa al 30% (Merck) durante una noche a 4°C.

Para hacer los bloques de criostato de las cabezas de los ratones se cortó el paladar y la parte anterior de la cabeza, se orientaron con la parte posterior de la cabeza en el fondo de los moldes y finalmente se incluyeron en Tissue-tek (*O.C.T. Compound made for Saruka Finetek Europe B.V.*). Los moldes se pusieron sobre nieve carbónica para la formación de los bloques de criostato. Se conservaron a -20°C.

Las copas ópticas de los ratones adultos se dispusieron de tal manera que el nervio quedara orientado hacía un lateral, marcando en los moldes la localización del nervio óptico (para facilitar la orientación del ojo a la hora de hacer los cortes) y se incluyeron del mismo modo que las cabezas.

Los cortes histológicos se hicieron horizontales en ambos casos, de un grosor de 15µm, con un criostato (Leica CM1900). Las secciones se recogieron en portaobjetos *SuperFrost Ultra Plus* (Menzel-Glaser) y se almacenaron a -20°C.

3.3.2.1. Procesamiento de las cabezas de los embriones

El procesamiento inmunohistoquímico de las secciones de tejido (Lavado y col., 2006), en portaobjetos, se llevaron a cabo con cestillos y cubetas de incubación (ZCT 280 y ZCT 281, Afora-Fisher Scientific) y una cámara húmeda para los pasos de bloqueo e incubación de los anticuerpos.

Las secciones, conservadas a -20°C , se descongelaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Se fijaron 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS y tras un lavado con PBS se incubaron 30 minutos con una solución de glicina 100mM (Merck) en PBS. Se volvió a hacer un lavado, esta vez con PBT (0.1% Igepal, CA-630 Sigma-Aldrich en PBS) durante 5 minutos y se permeabilizó con 0,1% de Tx-100(*t-octilfenoxipoli-etoxietanol*, Sigma) en PBS durante 15 minutos. Después de otro lavado de 5 minutos en PBT se procedió a delimitar las secciones con *PAP pen for immunostaining* (Sigma-Aldrich) para evitar la fuga de las distintas soluciones durante las incubaciones en la cámara húmeda.

Se colocaron los portaobjetos en la cámara húmeda y se siguió con el paso de bloqueo durante 1 hora con una solución constituida por un 10% de suero fetal bovino (Midimed) y 0,1% Tx-100 en PBS (atemperando el suero a 30°C).

A continuación se pasó a la incubación con el anticuerpo primario durante una noche a 4°C . Las diluciones de los anticuerpos se hicieron en un tampón formado por 2% FCS y 0,1% Tx-100 en PBS. Las diluciones y los anticuerpos primarios que se utilizaron se detallan en la **tabla IV**.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución utilizada
<i>Rabbit anti-Bassoon</i>	Invitrogen	1:50
<i>Rabbit polyclonal to Slc9a9</i>	Abcam	1:50
<i>Rabbit polyclonal to Bmf</i>	Abcam	1:100
<i>Rabbit polyclonal to TrkB</i>	Abcam	1:100
<i>Rabbit monoclonal to MKK6 C-term</i>	Epitomics	1:50
<i>Purified rabbit anti-human SPOCK2 polyclonal antibody</i>	ProteinTech Group, Inc	1:50
<i>Purified rabbit anti-human PTEN polyclonal antibody</i>	ProteinTech Group, Inc	1:50
<i>Purified rabbit anti-human FXD2 polyclonal antibody</i>	ProteinTech Group, Inc	1:50
<i>Purified rabbit anti-human RPH3A polyclonal antibody</i>	ProteinTech Group, Inc	1:100

Tabla IV. Anticuerpos y diluciones óptimas utilizadas en los análisis inmunohistoquímicos.

Después de 3 lavados con PBT de 5 minutos se continuó con la incubación de los portaobjetos protegidos de la luz con el anticuerpo secundario a una dilución 1:500(*Goat anti Rabbit-alexa488*). Tras otros 3 lavados en PBT de 5 minutos se tiñeron los núcleos con una dilución 1:200 de TOPRO-3(Invitrogen) en PBS durante 10 minutos. Y finalmente se hicieron cuatro lavados en PBS de 5 minutos para desechar el exceso de TOPRO-3.

Todos los pasos de incubación y lavado en las cubetas de incubación se llevaron a cabo con una ligera agitación en un agitador *HS250basic*, Ika labortechnik. El montaje de los portas se hizo con medio de montaje acuoso, Prolong y cubreobjetos de 24x60mm o 24x50mm.

Las preparaciones se dejaron secar una noche a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se guardaron a 4°C para su posterior análisis por microscopía.

3.3.2.2. Procesamiento de los ojos de ratones adultos

Con los cortes de criostato de las secciones centrales de los ojos adultos (donde aparece el nervio óptico) se hicieron dos tipos de ensayo de las diferentes conexiones sinápticas de la capa plexiforme externa de la retina: un ensayo de las conexiones entre las células bipolares y fotorreceptores y otro de las conexiones entre las células horizontales y los fotorreceptores (Cuenca y col., 2010).

Se siguió el mismo protocolo que en el apartado anterior (3.3.2.1.). Los dos anticuerpos primarios de cada ensayo, al ser de especies reactivas diferentes, se incubaron juntos en el mismo paso. Del mismo modo se procedió con los anticuerpos secundarios.

Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los siguientes: una dilución 1:25 de PKC- α (*Mouse anti-PKC- α H-7*, Santa Cruz Biotechnology INC) presente en las dentritas de las células bipolares, una dilución 1:20 de Bassoon (*Rabbit anti-bassoon*, ZYMED Laboratories) en las sinapsis tipo ribbon de los fotorreceptores, una dilución 1:100 de Calbindina (*Rabbit anti-calbindin D-28k*, Swant) en las dentritas de las células horizontales y una dilución 1:25 sinaptofisina (*Mouse anti-synaptophysin H-8*, Santa Cruz Biotechnology, INC) en el axón terminal de todos los fotorreceptores.

Y los anticuerpos secundarios, a una dilución 1:500, fueron *Goat α Mouse-Alexa488*, con marcaje en verde, y *Goat α Rabbit-Alexa594*, con marcaje en rojo (Invitrogen).

3.4. Microscopía electrónica

La extracción de los ojos se llevó a cabo dos horas después del encendido de las luces del animalario, momento en el que el sistema visual se encuentra a pleno rendimiento (Adly y col., 1999; Futter y col., 2004). Con estas condiciones se pudo hacer un análisis funcional y ultraestructural de las distintas capas de la retina en las mismas condiciones fisiológicas.

Las copas ópticas fijadas con 2% paraformaldehído y 2% glutaraldehído se enviaron al servicio de Microscopia Electrónica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), dónde se procedió a la inclusión en la resina, a la ultramicrotomía y a la tinción de las muestras.

3.4.1. Inclusión en resina

Las copas ópticas fijadas se lavaron tres veces con HEPES 0,4M pH 7,2, durante 15 minutos, a 4° C.

A continuación se procedió a la postfijación con tetróxido de osmio al 1% en ferricianuro potásico al 0,8% durante 1 hora a 4° C y tras 3 lavados con HEPES de 15 minutos a 4° C, con acetato de uranilo al 2% durante 40 minutos a 4° C.

Después de 3 lavados con agua *MilliQ* de 15 minutos a 4° C se pasó a la deshidratación de las muestras con incubaciones sucesivas, de 15 minutos a 4°C, en acetonas de concentraciones crecientes (50%, 70%, 90% y dos incubaciones de acetona 100%).

La infiltración se hizo, primero con una mezcla de acetona:epon al 50% (resina epon 811) durante una noche a temperatura ambiente con agitación suave (noria) y luego con epon 100% durante una noche.

Finalmente se encapsularon las copas, en plano, en moldes de silicona durante 48 horas a 60° C.

3.4.2. Ultramicrotomía

Se empezó devastando el bloque hasta llegar a la altura del nervio óptico, a partir de ahí se seleccionaron y tallaron dos zonas a ambos lados del nervio que se correspondían con la retina central.

Con una de esas zonas se hicieron cortes de 50-70 nm de grosor en un ultramicrotomo Leica EM UC6 y se recogieron las secciones en rejillas de oro recubiertas con formvar y carbón (**Figura 25**).

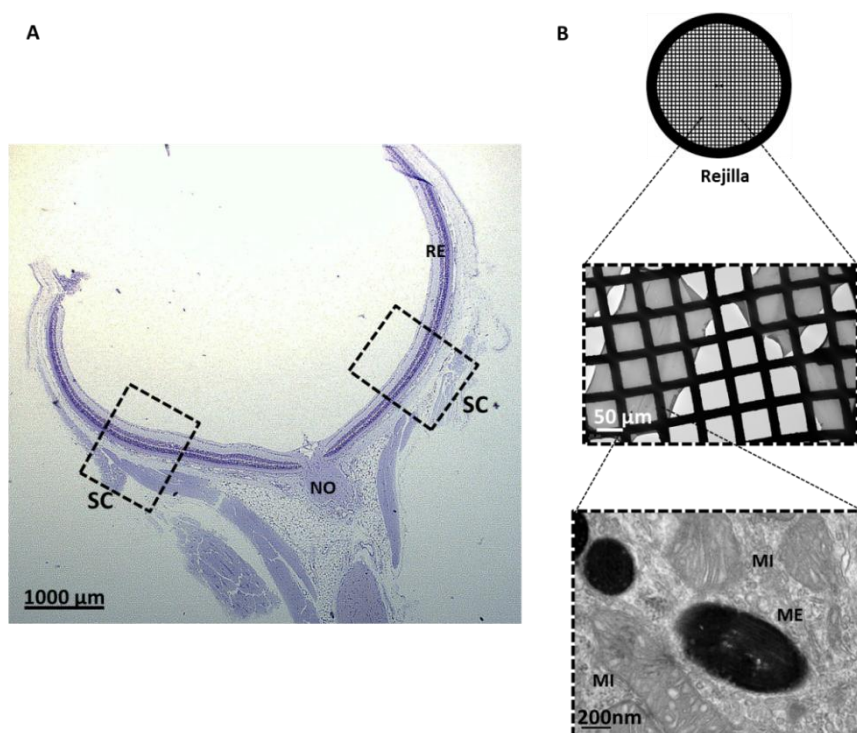


Figura 25. Procesamiento de las retinas para MET. **A-** Corte horizontal de la región central de una retina (RE) de ratón; se señala el nervio óptico (NO) y las secciones centrales (SC) de la retina, a partir de las cuales se hacen los cortes para microscopía electrónica. **B-** Rejilla donde se recogen los cortes ultra-finos e imágenes de los cortes teñidos a distintos aumentos; mitocondria (MI), melanosoma (ME).

3.4.3. Tinción

Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo saturado durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente con citrato de plomo durante 2 minutos (**Figura 25 –B**).

3.5. Toma y procesamiento de imágenes de microscopía

Las imágenes de campo claro de las preparaciones se tomaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMRXA con una cámara acoplada Leica DFC300FX.

Las imágenes de las preparaciones de inmunohistoquímica se hicieron con dos microscopios confocales: microscopio confocal Axiovert 200 (Zeiss) de óptica invertida y microscopio confocal espectral Leica TCS SP5. Estas imágenes no se procesaron informáticamente para preservar las diferencias observadas en las distintas fluorescencias, y así mantener las condiciones confocales de las mismas.

Las imágenes microscopía electrónica se hicieron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1011 (100 kV) con una cámara acoplada Erlangshen ES1000W.

Con el programa **Photoshop CS2** (Adobe) se hicieron los ajustes de brillo y contraste en las imágenes de microscopía electrónica.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA RETINA DE RATONES NMRI, TyrTH E YRT2 CON LA TECNOLOGÍA DE *MICROARRAYS* DE AFFYMETRIX

4.1. Extracción de ARN

Para la obtención de ojos de embriones de 18.5 d.p.c. NMRI, YRT2 y TyrTH se tuvo que hacer una cesárea a las hembras preñadas como se explica en el apartado 3.1.2. A las crías de 21,5 d.p.c. se las separó de la madre directamente. Todos los embriones y crías se anestesiaron con frío y se sacrificaron por decapitación.

La recolección de los ojos para la extracción de ARN se hizo mediante un corte en la piel de la parte superior de la cabeza, dejando expuestas las cuencas de los ojos para, con unas pinzas de puntas curvas, sacar el globo ocular y guardarlos en tubos Eppendorf estériles y libres de ARNasas. Todo el material utilizado, después de cada extracción, se limpió con agua DEPC (1 ml de dietilpirocarbonato por un litro de agua *MilliQ* y posterior autoclavado) y etanol de 70% para evitar contaminaciones y la degradación del ARN. Se mantuvieron los ojos en nieve carbónica y finalmente se almacenaron a -80° C para su posterior procesamiento.

Los embriones y las crías procedentes de los cruces entre ratones YRT2 y NMRI se pudieron determinar su genotipo por el fenotipo “color” de los ojos (YRT2 tiene los ojos negros y NMRI carecen de pigmento).

Para los procedentes de los cruces NMRI y TyrTH (ambos albinos) se precisó, en el momento de extracción de los ojos, de la recogida de una pequeña muestra de tejido para su posterior genotipado por PCR y SLOT BLOT (ver apartados 1.3.3. y 1.3.5.).

La extracción del ARN total de los ojos se hizo con el *kit Rneasy Mini kit* (Qiagen). Se añadió 600 µl del tampón RLT a cada muestra congelada a -80° C; de un peso máximo de 30 mg. Se homogenizaron todas las muestras con un Politrón (*Ultra-Turrax T8*, IKA labortechnik) y se extrajo el ARN siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Finalmente se resuspendió el ARN en 30 µl de agua libre de ARNasas y se guardaron a -80° C.

4.2. Cuantificación y análisis de calidad del ARN

La cuantificación del ARN se llevó a cabo con un espectrofotómetro miniaturizado Nanodrop (Nanodrop ND-1000), basado en la medida espectrofotométrica de la absorbancia del ARN a una longitud de onda de 260 nm.

Se comprobó el estado del ARN extraído en un gel de agarosa (Sea-Kem LE agarosa, LONZA) al 1.5%, identificando claramente las bandas de ARN ribosómico.

Igualmente, el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología comprobó calidad e integridad del ARN mediante análisis con el *Bioanalyzer Agilent 2100*.

4.3. Hibridación con *microarrays*

Los *microarrays* que se usaron fueron *GeneChip Mouse Genome Arrays 430 2.0* de Affymetrix. Cada *biochip* contiene 45.000 sondas que detectan 39.000 ARNs mensajeros y variantes de 34.000 genes caracterizados del genoma del ratón (**Figura 26**).

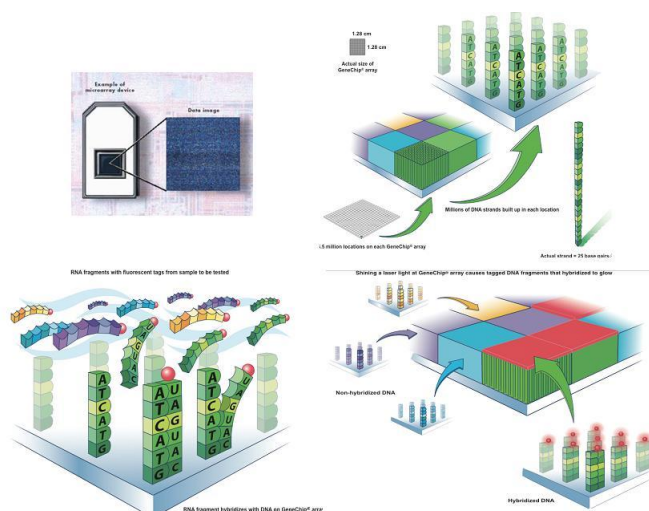


Figura 26. *Biochips* de Affymetrix. Cada cuadrícula de 1,28x1,28 cm contiene millones de copias de una sonda (25pbs) que detecta un aARN determinado; los fragmentos de aARN experimentales, marcados con biotina, hibridan con las sondas. Mediante el uso de un láser los fragmentos de aARN biotinilados brillan, creándose un patrón de intensidad de fluorescencia.

La Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología sintetizó los ADN copia a partir de ARN genómico, cebando la primera cadena con el cebador dT+promotor T7. Transcribió *in vitro* (TIV) el ADN copia de cadena doble con T7 ARN polimerasa, durante este proceso TIV se incorporó un nucleótido con biotina (al ARN transcrito *in vitro* se le denomina aARN). A continuación se fragmentó el aARN biotinilado y se hibridó, cada muestra, con un *biochip* independiente. La detección de la señal se realizó con estreptavidina + anticuerpo antibiotina-estreptavidina (**Figura 26**).

Esos *biochips* hibridados se escanearon con *GeneChip Scanner 3000*; de donde se obtuvieron patrones de intensidad que finalmente fueron convertidos por *GeneChip Operating Software v1.1.1 o v1.0 with High-Resolution Scanning Patch* en archivos “cel”.

Los archivos cel. almacenan los cálculos de intensidades, como son por ejemplo, los valores de intensidades ($\log\text{-intensity}/\log\text{-signal}$) o la desviación estándar de los valores de intensidades (StdErr).

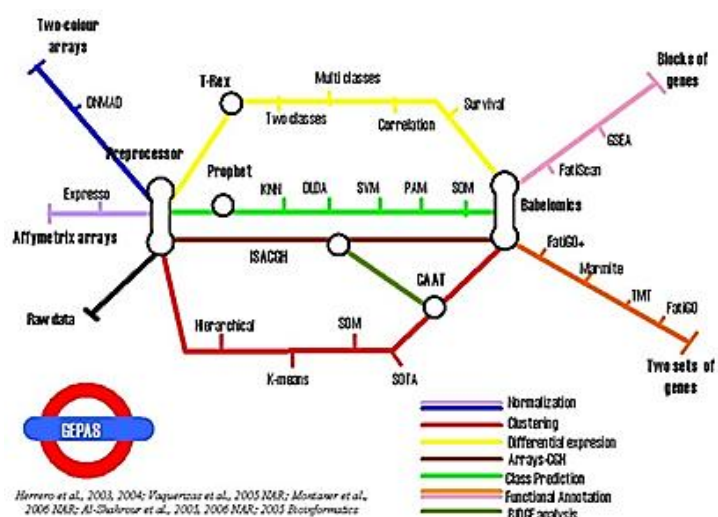
4.4. Análisis de los datos de expresión

Los archivos tipo cel. obtenidos de los experimentos con *microarrays* de Affymetrix se analizaron con el paquete estadístico LIMMA.

LIMMA está diseñado para analizar experimentos complejos de comparaciones múltiples simultáneamente. La idea es ajustar los datos de expresión de cada gen, dados por los valores de intensidades, a un modelo lineal (Smyth y col., 2005). A continuación

También se utilizó otro paquete informático, **GEPAS v3.1** (*Gene Expression Pattern Analysis Suite*; Montaner y col., 2006) del departamento de bioinformática del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe.

Para el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados se utilizó la aplicación bioinformática de genómica funcional **Babilomics**, concretamente, **FatiSCan**. Este programa permite localizar funciones aunque no todos los genes estén sobre-expresados.



Se usó el servidor de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) y Entrez Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed>) para conseguir toda la información referente a los genes que venían codificados con nomenclatura ID (nomenclatura de los genes, proceso biológico, función molecular y componente celular).

4.5. PCR cuantitativa con *SYBRGREEN*

4.5.1. Retrotranscripción

Para manejar mejor la concentración de los ARNs totales resuspendidos, se llevaron todos a un volumen final de 4 µl con agua DEPC.

Se trató el ARN extraído con ADNsa I (Roche, Ncat. 776785); no más de 20 µg de ARN total con 10 unidades de ADNsa I durante 20 minutos a 37° C. Luego se inactivó la ADNsa I 10 minutos a 90° C.

La retrotranscripción del ARN total a ADN copia para la PCR cuantitativa se llevó a cabo mezclando 1µg de ARN total con 0,5µg de *Random Hexamers* (Invitrogen), 1µl dNTPs 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y agua DEPC hasta un volumen final de 12,5 µl.

La mezcla se calentó a 65° C 5 minutos y a continuación se enfrió en hielo durante 5 minutos para eliminar cualquier posible estructura secundaria.

Posteriormente se añadió 4µl de tampón 5x *First Strand*, 2µl de 0,1M de DTT y 1µl de *RNase OUT* (todo de Invitrogen) y se calentó a 25° C durante 10 minutos. Tras 2 minutos a 37° C se añadió 100 unidades de *SuperScript III* y se incubó 50 minutos a 37° C. Para inactivar la enzima se incubaron las 70° C durante 15 minutos.

Finalmente se comprobó la eficiencia de la retrotranscripción cargando 1µl del producto obtenido en un gel de agarosa al 1,5%.

Se guardó a -20° C hasta su posterior utilización.

4.5.2. Diseño de los cebadores de los genes candidatos

El diseño de los cebadores para amplificar los genes candidatos se hizo con ayuda del programa **Primer Express** (ABI PRISM de Applied Biosystems) y **Ensembl** (<http://www.ensembl.org/index.html>) para obtener las secuencias exónicas de los genes (**Tabla V**).

Gen	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	Producto amplificación (pb)
<i>Ap3s2</i>	TGG AAG TTT GAT TGG TGG CTC	GCA TAG TGC CGG TAA ATC AGT TT	51
<i>Aplp1</i>	CCA GGA GCT TCT CCT TGC TG	CAC AGA GGC GTC CAG TTC ACT	55
<i>Atn1</i>	GAC ACG ACA GAA TAA AGA CTC GAT G	TCT TTC TTC CGT CCA CTC CTC A	51
<i>Bmf</i>	CAG ACC AGT TCC ATC GGC TT	GGT CTC GGT TCT GCT GGT GT	51
<i>Calcoco1</i>	CAA GGA GCA GAG TGA GGC TGA	CAG CAG TTC TCC TCT CGG ACC	51
<i>Ergic3</i>	CTA GAC AAG GAT GGC GTC CC	AAG CTC GTG CCG TTC AGC	51
<i>Fxyd2</i>	GCC TGG CCT TCG TCG TG	AGC GGA ACC TTT TGC TGA GA	51
<i>Gpr173</i>	GAC ACT CTG GAC ATG CGC AG	ACA GAC AAG GTC CAG GCC AT	51
<i>Jund1</i>	TAC CCC GAC CAG TAC GCA GT	TCC TCG CTA GCT GCC ACC T	51
<i>Kif1c</i>	CCC TTG ATG TCT GAA TGT CTT CTC T	CCT GGT GAC GCC ATC TTT G	51
<i>Mad1l1</i>	TCA TCA AAG GAG GTG GCA GAG	CAG CTC AGC ACT TTC CAC CTC	51
<i>Map2k6</i>	GCA ACA TCC ATT TTT CAC CGT	GAT GCC ACG TCT GCT GCT T	51
<i>Ntrk2</i>	TCT CCG CTC ACT TCA TGG G	TTG GGT TTG TCT CGT AGT CGA CT	51
<i>Pim1</i>	TCT TCA GAG TGT CAG CAC CTT ATT AAA	TGA TGG TCT CAG GGA CAG GC	51
<i>Pitpnm2</i>	ATC CCT TCC CTG GAC GTT TT	GTA CAC TTG CTG ACA CGC TGG	51
<i>Ptk2</i>	TGA CGT GTG GAT GTT TGG TGT	ACG CCA TGC ATC AGT ATC TCC	51
<i>Rph3a</i>	AGG GAC TGA AGC CCA TGG AT	GCT TCA CAT AFF FAT CTG CCA	51
<i>Slc9a9</i>	TTT TCA GGT TTG CAG GGT GC	CGT GTT GCG GAT GGC C	51
<i>Spock2</i>	GAG CAC AGG ATC AAG CAG CC	GGA GTC TTT GCC TCC GTG G	51
<i>Zfp57</i>	CCT CTG CCT GGA TAC CAG GTC	TGA TTC TTG AAG GCT TGT GGG	51

Tabla V. Cebadores utilizados en las PCRs cuantitativas.

4.5.3. Obtención de productos de PCR de ADN copia de los genes candidatos

Para la obtención de las sucesivas bandas amplificadas de los genes candidatos se partió de una de las muestras de ADN copia, resultante de la retrotranscripción de los correspondientes ARN, como molde.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µl, contenía 2,5 µl de tampón de PCR 10x (Roche), 2,5 µl de dNTPs 10x, 0,5 µl del cebador *forward* 100 µM, 0,5 µl del cebador *reverse* 100 µM, 0.25 µl Taq-polimerasa (5 u/µl, Roche), 17,25 µl de agua *MilliQ* estéril, 0,5 µl de MgCl₂ (Roche) y 1 µl del ADN copia.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (*MJ Research, Inc*) siguiendo el siguiente programa: 2 minutos 50° C, 10 minutos 95° C, 15 segundos 95° C y 1 minuto 60° C (por 40 ciclos), ∞ a 4° C.

Para comprobar la correcta amplificación de las distintas bandas se usó 4 µl del producto de la PCR para correr en un gel de agarosa de baja temperatura de anillamiento al 3% (*Nusieve GTG Agarose*, Cambrex Bio Science Rockland, Inc).

Las bandas amplificadas tenían un tamaño que oscilaba entre 51 pb-55pb, por lo que se usó un marcador de peso molecular de 25 pb ADN *ladder* (Invitrogen).

El resto del producto de amplificación (21 µl) se purificó en un gel de agarosa al 2% con el kit comercial “*GFX PCR ADN and Gel band Purification kit*” (GE- Healthcare), disolviendo en 10-50 µl de tampón TrisClH dependiendo del peso del gel de agarosa (para geles de >300 ng, 10-50 µl de tampón y para geles de >500ng, 50 µl de tampón).

4.5.4. Conversión de los datos de la concentración de ADN copia de cada uno de los genes candidatos en número de moléculas/µl.

Para la conversión de datos de concentración en número de moléculas/µl fue necesario conocer la concentración ng/µl de cada banda (medida en el nanodrop), y el tamaño de la banda en pares de bases.

Sabiendo que 1 mol de una banda de 1 pb tiene, en promedio, un peso molecular de 660g se pudo calcular los gramos de las bandas de los genes candidatos; y por tanto la molaridad (Giménez y col., 2003; Lavado, 2006).

Multiplicando la molaridad por el número de Avogadro (6.022×10^{23}) se halló el número de moléculas/l. Y a partir de ahí el número de moléculas/µl que contienen la bandas amplificadas de los distintos genes candidatos.

4.5.5. Diluciones seriadas de cada producto de PCR

Se hicieron diluciones seriadas (10^{-2} hasta la 10^{-9}) de todas las bandas amplificadas, para posteriormente hacer una recta patrón.

4.5.6. Optimización de las diluciones de los cebadores

Para la optimización de las diluciones de los cebadores más adecuada para hacer la PCR cuantitativa de los genes candidatos se siguió el protocolo desarrollado por Applied Biosystems (**Tabla VI**) (*Power SYBR Green PCR Master Mix Protocol*).

La mezcla de reacción para un volumen final de 25 µl fue de 12,5µl de *Master mix* (*Power SYBR Green PCR Master Mix P/N: 4367659*), 2 µl de ADN copia de una dilución 1/50 del producto de la retrotranscripción (1µg/µl), 5,5 µl agua *MilliQ*.

Se repartió 20 µl de la mezcla en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (*96- Well Optical Reaction Plate with Barcode, code 128, P/N: 4306737* de Applied Biosystems) y se añadió 2,5 µl del cebador *forward* y 2,5 µl del cebador *reverse* a la dilución que le corresponda según la tabla sacada del protocolo de Applied.

Cebador <i>reverse</i>	Cebador <i>forward</i> (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Tabla VI. Diluciones de los cebadores para determinar la concentración óptima.

Se selló la placa (*MicroAmp optical Adhesive Film*, P/N: 4311971) y centrifugó 1 minuto a 1000 rpm.

La reacción se llevó a cabo en un ABISPRISM 7000 (Applied Biosystems). El programa de amplificación constó de un paso de 50° C de 2 minutos, 95° C 10 minutos, 95° C 15 segundos (x 40 ciclos), 60° C 1 minuto.

4.5.7. Optimización de las diluciones de los productos de PCR

Se hizo una PCR cuantitativa con todas las diluciones seriadas (10^{-2} hasta 10^{-9}) de cada banda amplificada.

La mezcla de reacción, para un volumen final de 25 µl, contenía: 12,5 µl del *Master mix*, 5,5 µl de agua *MilliQ*, 2,5 µl del cebador *forward*, 2,5 µl del cebador *reverse*, 2 µl de la dilución de la banda que corresponda. Cada dilución se hizo por duplicado.

La reacción se hizo en placas de 96 pocillos, en el mismo termociclador y con el mismo programa de amplificación descrito en el apartado anterior.

Una vez obtenidos los valores de Ct para cada dilución (como cada muestra estaba por duplicado se hizo la media de los dos valores de Ct), se seleccionaron las cinco diluciones, de cada banda, con los mejores valores de Ct; considerando como valores buenos de Ct los comprendidos entre 10-35.

4.5.8. Optimización de la concentración del ADN copia

Se hicieron pruebas con distintas diluciones de ADN copia y se consideró que la dilución óptima era 1:50 del ADN copia obtenido de la retrotranscripción de 1 µg de ARN total.

4.5.9. PCR cuantitativa de los genes candidatos.

Las PCRs a tiempo real se llevaron a cabo siguiendo el patrón representado en la **Figura 28**.

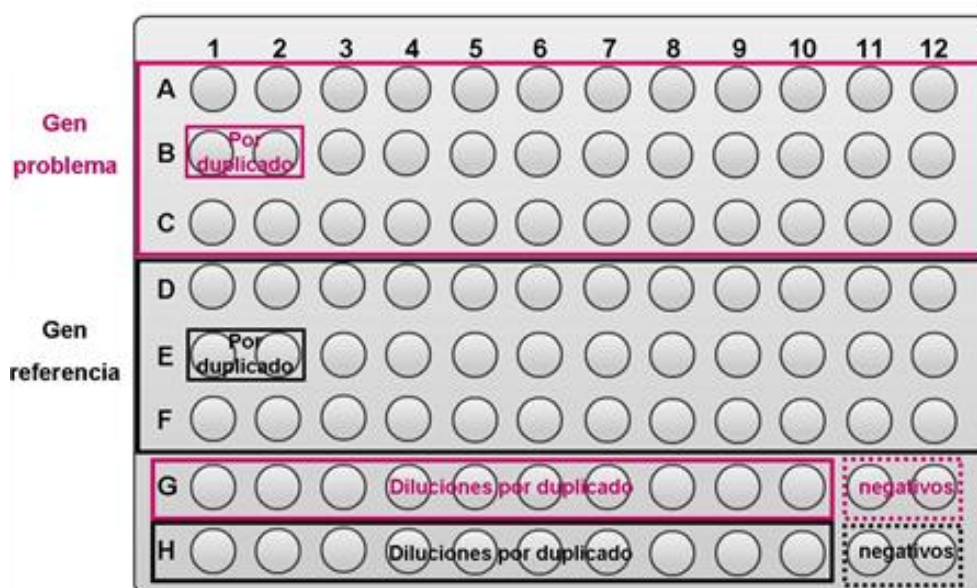


Figura 28. Distribución de las muestras, en una placa de 96 pocillos, para el análisis por PCR cuantitativa de cada gen problema.

La mezcla de reacción para un volumen final de 25 μl fue: 12,5 μl del *Master mix*, 5,5 μl de agua *milliQ*, 2,5 μl de primer *forward* a la dilución óptima, 2,5 μl de primer *reverse* a la dilución óptima y 2 μl del ADN copia (a una dilución óptima de 1/50) corresponda a cada pocillo, siguiendo el patrón anteriormente descrito.

Se sellaron las placas y se les dio un pulso a 1000 rpm.

La reacción se llevó a cabo en un ABISPRISM 7000, con el mismo programa al que hemos hecho referencia en los apartados anteriores, añadiéndole un paso más para la obtención de la curva de disociación.

4.5.10. Análisis estadísticos de los resultados

La normalización y expresión de los resultados se llevó a cabo por cuantificación relativa siguiendo el método de la curva patrón descrito anteriormente en el laboratorio (Giménez y col., 2003; Lavado, 2006).

Primero se hizo la normalización de los resultados de Ct obtenidos. A continuación, sabiendo de cada gen problema la molaridad de la banda purificada (cálculos explicados en apartado anterior) se halló el número de moléculas/ μl que había en cada dilución de la banda. Con el número de moléculas/2 μl y la media de los valores de Ct se calculó la ecuación de la recta patrón, para luego extrapolar los valores de Ct de las muestras experimentales y conocer su número de moléculas/ μl .

Una vez calculados los números de moléculas/ μl de las muestras experimentales para el gen problema y el gen de referencia (β -actina), se hizo la proporción de moléculas del

gen problema con respecto a la β -actina para saber si estaba más o menos expresado que la β -actina (gen con la misma expresión en todos tejidos).

Se realizó una comparación múltiple anova post-hoc con correlación de Bonferroni con el programa informático **Statview** de los valores del número de moléculas de cada gen problema, con respecto al gen de referencia (β -actina) y se representó gráficamente.

5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS CON LA PLATAFORMA ILLUMINA GOLDENGATE

Para el estudio de los polimorfismos genéticos en la cepa HsdWin:NMRI se utilizó la plataforma de genotipado “*Illumina Goldengate, Linkage Mapping Panel*”. El panel de *Illumina* contenía 1449 SNPs de los 20 cromosomas de ratón, aproximadamente 3 SNPs por cada 5 Mb del genoma (**Figura 29**). Este mismo panel se usó previamente con éxito para determinar los polimorfismos genéticos entre diversas subcepas de ratón relacionadas con C57BL/6 (Zurita y col., 2011)

Para hibridar con el panel de *Illumina* se precisaron de ADNs obtenidos por biopsias de cola, como se ha descrito anteriormente, de animales de la F0, F1 y F2 procedentes de familias independientes (el diseño de los cruces se describe en el apartado de mantenimiento de colonias de ratones).

La cuantificación e hibridación de las muestras de ADN con la placa de *Illumina* se llevó a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) en su nodo del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid.

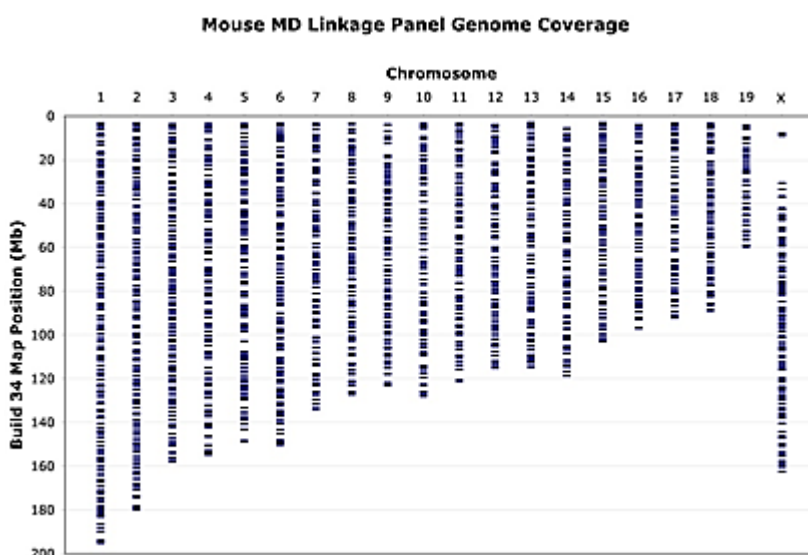


Figura 29. Illumina Goldengate, Mapa del panel de ligamiento genético.

5.1. Análisis de ligamiento genético

El departamento de bioinformática del CNIO se encargó del análisis de ligamiento genético de los resultados obtenidos de la hibridación con la placa de *Illumina* y de los fenotipos detectados a los ratones. Para ello se usaron dos programas informáticos: **Merlin** y **Simwalk**.

Para el estudio de la región polimórfica y de los genes candidatos de dicha región se usaron los siguientes programas informáticos: **Ensembl Genome Browser** para localizar los SNPs polimórficos y determinar las coordenadas en el genoma (<http://www.ensembl.org/index.html>). **Biomart**, una aplicación de *Ensembl*, para obtener listas de genes con distintos identificadores. **aGem 3.0** (Jiménez-Lozano y col., 2009) para hacer análisis de expresión anatómica de una lista de genes y **Genecodis 2.0** para conseguir las distintas anotaciones de los genes (Carmona-Saez y col., 2007; Nogales-Cadenas y col., 2009).

5.2. Secuenciación de la zona codificante

Con objeto de proceder a secuenciar determinados genes se localizó la secuencia de cada uno de los genes candidatos en *Ensembl* y se añadieron 100 pb más a ambos extremos del gen (porque las 50 primeras y últimas pares de bases del fragmento a amplificar podían contener errores), con esta secuencia se diseñaron los cebadores para cada uno de los exones y regiones UTR con el programa *primer 3* de Biotools; diseñando los cebadores unos 50 pb fuera de la secuencia del exón en los dos extremos.

A continuación se comprobó que la secuencia que se iba a amplificar con los cebadores diseñados era única, para ello se usó la aplicación *In-Silico PCR* de UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

Los fragmentos amplificados por PCR se obtuvieron con una taq polimerasa de alta fidelidad (*Expand High Fidelity PCR System* de Roche, cat. No. 11 759 078 001), se comprobó el tamaño y calidad de la banda amplificada con un gel de agarosa al 0,8%.

El producto de PCR obtenido se purificó con el kit de *Qiagen (QIAquick PCR Purification kit, Cat. No. 28106)* y se envió para su secuenciación a Macrogen (Corea del Sur) o al Parque Científico de Madrid.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con **BioEdit Sequence Alignment Editor**.

5.3. PCR cuantitativa con sondas Taqman (método $2^{\Delta\Delta Ct}$)

El nivel de expresión de algunos de los genes candidatos se evaluó mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando sondas Taqman prediseñadas por la casa comercial (**Tabla VII**) (*pre-designed Taqman gene expression assays*, Applied biosystems). Las reacciones se realizaron con una dilución 1:50 del ADN copia resultante de la retrotranscripción de 100 ng de ARN con *Taqman universal PCR master mix (Part*

Materiales y métodos

Number 4304437, Applied Biosystems) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.


La normalización y expresión de los resultados se llevó a cabo por cuantificación relativa siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Gen	Sonda	Localización (exones)	Tamaño amplificación (pb)
<i>Pde5a</i>	Mm00463177_m1	11-12	65
<i>Abca4</i>	Mm00492035_m1	36-37	62
<i>Gnat2</i>	Mm00492394_m1	4-5	71
<i>Gpsm2</i>	Mm00512842_m1	11-12	102

Tabla VII. Sondas Taqman utilizadas.

6. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES DE LA REGIÓN DELIMITADA POR EL ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

En colaboración con el Doctor Fernando Benavides de la Universidad de Texas (MD Anderson Cancer Center, Smithville, Texas), especialista en análisis de SSLPs (*Single Sequence Length Polimorfism*) (Benavides y col., 2001), se hicieron estudios de análisis de polimorfismos de la región delimitada por los análisis de ligamiento en muestras de ADN con fenotipo normal y con fenotipo *coneless*.



7. SECUENCIACIÓN DE EXOMAS DE RATÓN CON PLATAFORMA AGILENT

La secuenciación de los exomas de ratón se hizo en BGI Hong Kong Co. se, filtrando los resultados en la región polimórfica. Para ello se usó la tecnología de Illumina HiSeq2000.

Primero se comprobó la cantidad y calidad de las muestras mediante su cuantificación con *Qubit Fluorometer* y con su visualización en un gel de agarosa al 1%. A continuación se construyeron las librerías de cada muestra con el kit de captura de exoma *Agilent SureSelect Mouse All Exon* (50Mb, 50x) y finalmente se abordó la estrategia de secuenciación.

El ADN genómico cualificado fue fragmentado con un sonicador (Covaris) obteniendo una librería de fragmentos de ADN de entre 150-200 pb. Con el kit *NGS* se unieron los adaptadores a ambos extremos de los fragmentos de ADN y con el kit *Agencourt AMPure SPRI* se purificaron dichos fragmentos unidos a los adaptadores (250 pb). El ADN purificado se amplificó por LM-PCR (ligación mediada por PCR), se purificó e hibridó con fragmentos de una librería de ARN biotinilada (*Sureselect Biotiny lated RNA Library, BAITs*). Seguidamente se hibridaron los fragmentos biotinilados con estreptavidina; aquellos fragmentos que no hibridaron fueron lavados después de 24 horas. Los productos de LM-PCR fueron analizados con **Agilent 2100 Bioanalyzer** para estimar la magnitud del enriquecimiento.

Las librerías se cargaron en la plataforma HiSeq2000 y se procedió a la secuenciación de alto rendimiento. Los archivos de imagen RAW fueron procesados por **Illumina basecalling Software 1.7** y analizados con el programa **SOAPaligner/SOAP2** (Figura 30).

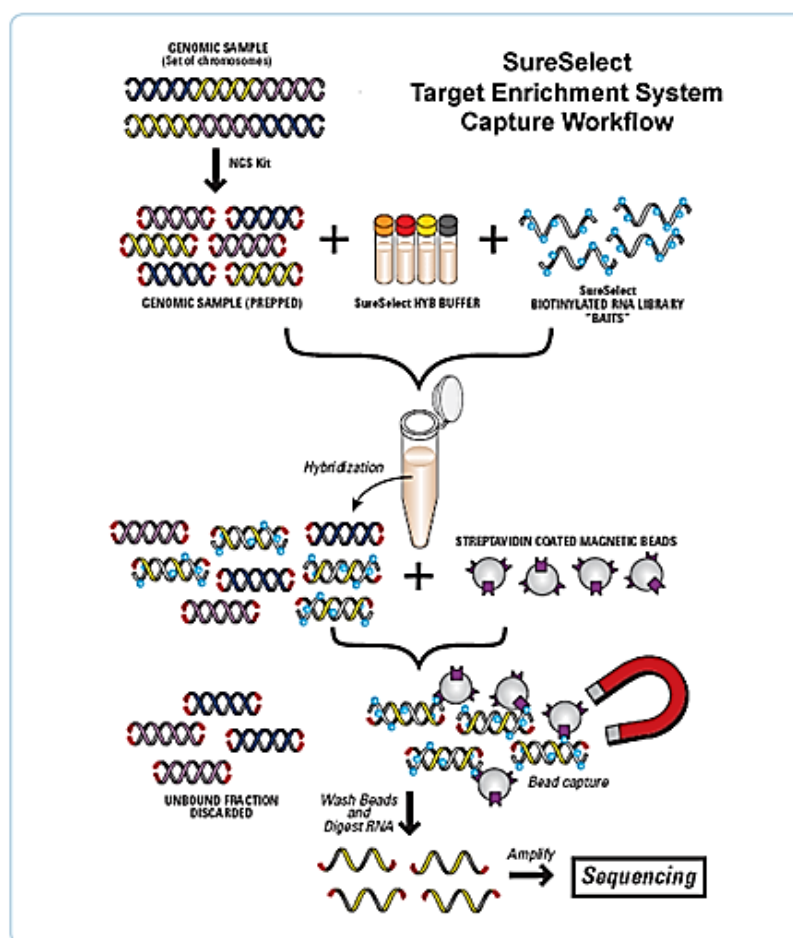


Figura 30. Representación esquematizada del proceso de secuenciación masiva (NGS) para la obtención de exomas de ratón.

El análisis bioinformático y visualización de los resultados se realizó en el servicio de genómica del CNB (J.C. Oliveros) a través del programa **IGV 2.1** (*Integrative Genomics Viewer*, <http://www.broadinstitute.org/igv/>). Con este programa se compararon los resultados de la secuenciación de las 6 muestras con un archivo que contenía los SNPs polimórficos de la región delimitada anteriormente por el análisis de ligamiento genético, que aparecían en las muestras homocigotas mutantes (aa) pero no en las muestras homocigotas salvajes (AA).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA EN RETINA DE VARIOS MODELOS ANIMALES DE ALBINISMO

El objetivo de este estudio era el de analizar diferencias de expresión génica en un modelo de albinismo oculocutáneo tipo I (OCAI). Para ello se utilizó la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI como modelo OCAI y dos modelos de ratones transgénicos, el YRT2 (Schedl y col., 1993), con fenotipo pigmentado y el TyrTH (Lavado y col., 2006), que aun manteniendo un albinismo aparente tienen un fenotipo visual normal; ambos generados en fondo HsdWin:NMRI.

Se hizo el estudio en dos etapas importantes para el desarrollo de la retina, a 18,5 d.p.c. día cuando concluye la primera fase de la retinogénesis (diferenciación células ganglionares, horizontales, amacrinas y los conos) y a 21,5 d.p.c. que coincidiría con la segunda fase de la retinogénesis (diferenciación de los bastones, las células bipolares y las células de Müller (**Figura 32**). Ambas fases ya habían sido utilizadas con éxito en experimentos anteriores (Giménez y col., 2005).

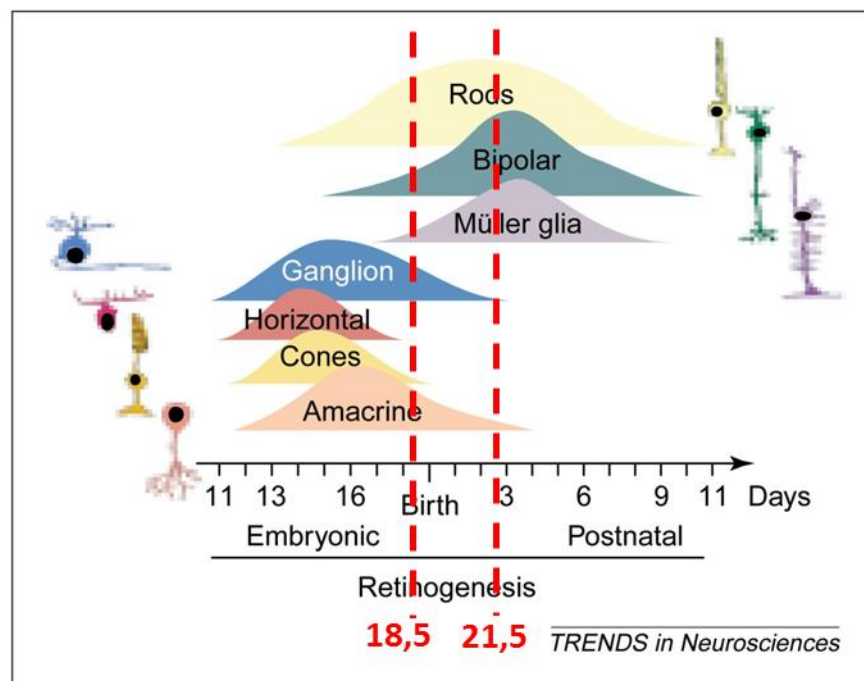


Figura 32. Representación temporal del desarrollo de los distintos tipos celulares de la retina de ratón. Los estadios de desarrollo seleccionados para el experimento aparecen señalados en rojo (modificada de Marquardt y Gruss, 2002).

Resultados

1.1. Análisis de expresión con *microarrays*

1.1.1. Cruces

De un total de 32 cruces establecidos entre ratones NMRI/YRT2 y 24 entre ratones NMRI/TyrTH se consiguieron 12 y 17 hembras preñadas respectivamente que se repartieron para obtener embriones de 18,5 d.p.c y crías de 21,5 d.p.c como se indica en la **Tabla VIII**.

Cruces	Diseñados	Productivos	18,5 d.p.c	21,5 d.p.c
NMRI/YRT2	32	12	7	5
NMRI/TyrTH	24	17	8	9

Tabla VIII. Número de cruces previstos y obtenidos entre ratones NMRI e YRT2.

El genotipado de los embriones y las crías procedentes de los cruces NMRI/YRT2 se hizo por examen visual, los individuos con ojos pigmentados eran YRT2 y los que no tenían pigmento eran NMRI (**Figura 33**).



Figura 33. Crías de 21,5 d.p.c. Cría NMRI sin pigmento y cría YRT2 con pigmento en ojos y piel.

Para los que procedían de los cruces NMRI/TyrTH, al carecer todos ellos de pigmento, se tuvo que genotipar por PCR a partir de una pequeña biopsia de tejido y confirmar la presencia del transgén por SLOT-BLOT (cada muestra se hizo por duplicado) (**Figura 34**). El número total de embriones y crías que se consiguieron se describen en la **Tabla IX**.

Cruces	Embriones y crías					
	totales		18,5 d.p.c		21,5 d.p.c	
	salvaje	transgén	salvaje	transgén	salvaje	transgén
NMRI/YRT2	49	77	33	55	16	22
NMRI/TyrTH	79	76	49	37	30	39

Tabla IX. Número de embriones de 18,5 d.p.c y crías de 21,5 d.p.c obtenidos de los cruces entre ratones NMRI e YRT2 y entre NMRI y TyrTH.

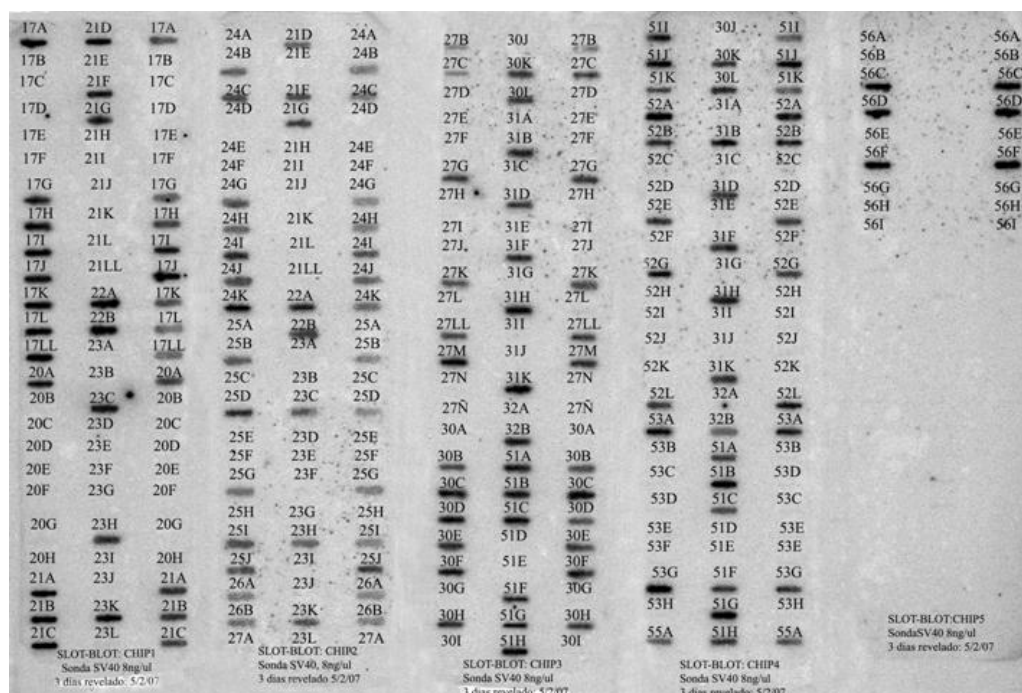


Figura 34. Exposición membranas de hibridación para la detección del transgén TyrTH mediante SLOT-BLOT.

1.1.2. Combinación de muestras de ARN

Con el objeto de minimizar la variabilidad entre muestras, al tratarse de una colonia de ratones no consanguíneos, se decidió hacer combinaciones de varios embriones y de varias crías y analizarlas de forma conjunta, tras discutir el diseño experimental con el Servicio de Genómica del CNB.

Una vez se obtuvieron todos los individuos genotipados se hicieron 18 combinaciones agrupadas de ojos (cada grupo, formado por unos 20-30 ojos de embriones/postnatales procedentes de 3 hembras diferentes), correspondientes a los tres tipos de ratones NMRI, YRT2 y TyrTH, en los dos estadios de desarrollo (18.5 y 21.5 d.p.c) y por triplicado (**Tabla X**, a cada grupo se le asignó un número, por ejemplo, ARN1, 2, 3...). Se extrajo el ARN de las 18 combinaciones de ARN, se cuantificó su concentración con el Nanodrop y se comprobó su calidad con un gel de agarosa al 1,5% y con el Bioanalyzer.

ARN	Réplicas experimentales		
	A	B	C
YRT2 18,5	ARN1	ARN2	ARN3
YRT2 21,5	ARN4	ARN5	ARN6
TyrTH 18,5	ARN7	ARN8	ARN9
TyrTH 21,5	ARN10	ARN11	ARN12
NMRI 18,5	ARN13	ARN14	ARN15
NMRI 21,5	ARN16	ARN 17	ARN18

Tabla X. Grupos de combinaciones de ARN para los tres modelos animales de ratón (YRT2, TyrTH y NMRI) en dos estadios de desarrollo (18,5 y 21,5 d.p.c) por triplicado (A, B y C).

1.1.3. Hibridación con *microarrays* de Affymetrix

En el Servicio de Genómica del CNB se encargaron de la obtención del ADN copia de cada combinación de ARN y a partir de él el aARN (ARN transcrito *in vitro*), que se marcó a su vez con biotina. El aARN marcado de cada combinación se hibridó con un *biochip* independiente (apartado 4.3. de materiales y métodos). En total se hibridaron 18 *biochip*, cada uno con una de las 18 combinaciones (**Tabla X**).

Los resultados de los valores de intensidad de fluorescencia se obtuvieron en 18 archivos de tipo *cel* (3 modelos animales, 2 edades desarrollo y por triplicado).

1.1.4. Análisis informático

El análisis estadístico de los resultados de expresión génica se hizo con dos programas informáticos distintos: **FIESTA**v1.0 y **GEPAS**v3.1.

Con **FIESTA** se compararon los resultados de *microarrays* de los tres modelos animales NMRI, TyrTH e YRT2 en los dos estadios de desarrollo (18,5 y 21,5 d.p.c). Las comparaciones se hicieron de dos en dos: TyrTH y NMRI 18,5 d.p.c, TyrTH y NMRI 21,5 d.p.c, TyrTH e YRT2 18,5 d.p.c, TyrTH e YRT2 21,5 d.p.c, YRT2 y NMRI 18,5 d.p.c y YRT2 y NMRI 21,5 d.p.c. La representación de los gráficos de comparación de las intensidades de fluorescencia de las seis combinaciones se muestra en la **Figura 35**.

Se fijaron como resultados significativos aquellos que tenían $FDR < 0,05$, obtenidos con el paquete estadístico LIMMA. Utilizando **FIESTA** no se encontraron resultados estadísticamente significativos de expresión diferencial en ninguna de las seis comparaciones. Tan sólo en las comparaciones: TyrTH y NMRI 18,5 d.p.c, YRT2 y NMRI 18,5 d.p.c y YRT2 y NMRI 21,5 d.p.c (**Figura 35-A, E y F**) aparecen dos genes que aparentemente se encuentran diferencialmente expresados (puntos azules), que se corresponden con dos controles que incluye Affymetrix en sus análisis, por lo tanto no son relevantes.

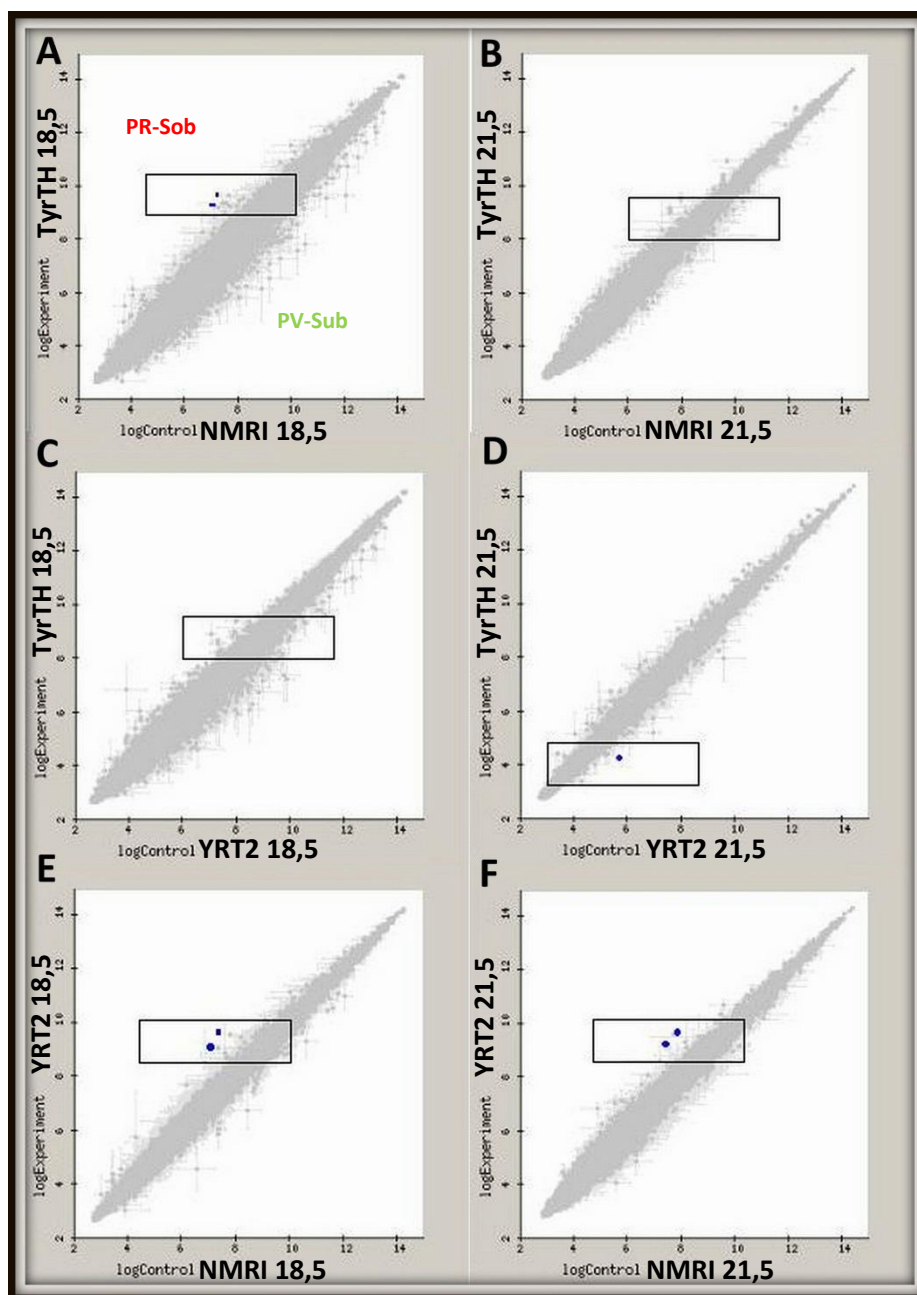


Figura 35. Gráficos de comparación de intensidades de fluorescencia de cada gen entre dos modelos animales: **A-** TyrTH y NMRI 18,5 d.p.c, **B-** TyrTH y NMRI 21,5 d.p.c, **C-** TyrTH e YRT2 18,5 d.p.c, **D-** TyrTH e YRT2 21,5 d.p.c, **E-** YRT2 y NMRI 18,5 d.p.c y **F-** YRT2 y NMRI 21,5 d.p.c. Si hubiera expresión diferencial estadísticamente significativa, se visualizarían puntos rojos que se corresponderían con genes sobre-expresados (PR-Sob) y puntos verdes que se corresponderían con genes poco expresados (PV-Sub) con respecto al experimento eje de las X. Los puntos azules se corresponden a controles de Affymetrix.

A la vista de los resultados estadísticamente no significativos que se obtuvieron con **FIESTA**, se decidió reanalizar los resultados con otro programa informático, en este caso **GEPAS v3.1**. Para ello en primer lugar, se normalizaron los datos de las tablas “cel” (**Figura 36**), se preprocesaron y finalmente se hicieron varios análisis de expresión

diferencial multiclases, **T-Rex** (test Anova) cambiando el número de clases, es decir, el modo de agrupar los 18 modelos experimentales para su análisis posterior.

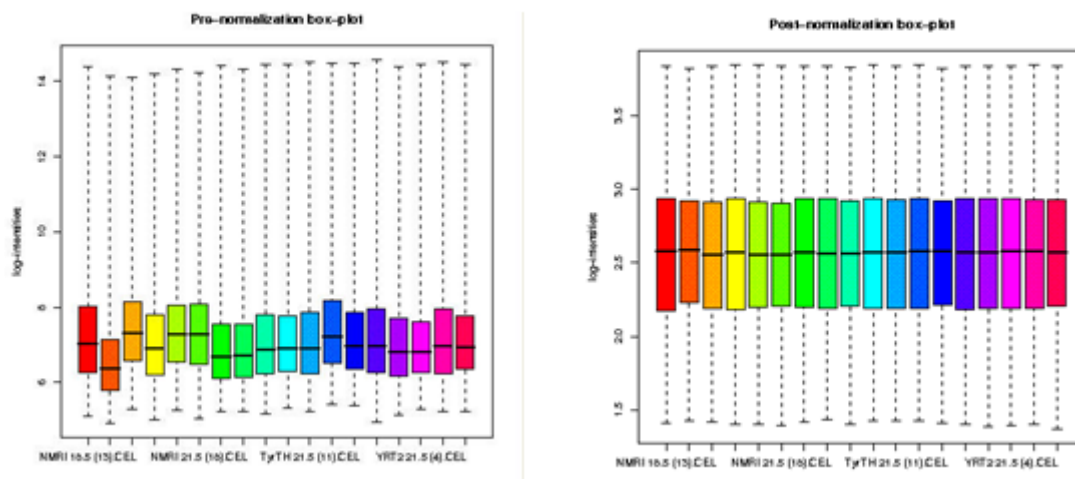
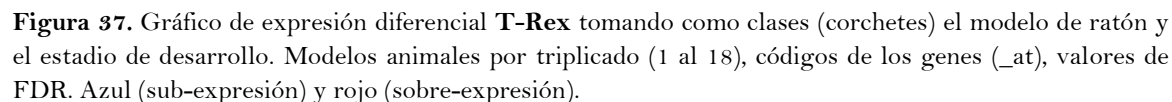


Figura 36. Gráficos de normalización. GEPAS v3.1.

Primero se tuvo en cuenta el tipo de ratón (NMRI, TyrTH e YRT2) y los dos estadios de desarrollo (18.5 y 21.5 d.p.c) (**Figura 37**), en segundo lugar teniendo en cuenta sólo los modelos de ratón (NMRI, TyrTH e YRT2) (**Figura 38**) y por último tomando como clase los estadios de desarrollo seleccionados (18.5 y 21.5 d.p.c) (**Figura 39**) y agrupándolo por los diferentes modelos de ratón analizados.

T-Rex representa los resultados de expresión diferencial como una matriz de colores; en las columnas se representan los resultados de expresión de los distintos experimentos con un código de colores, dónde rojo es sobre-expresión y azul sub-expresión. Cada fila se corresponde con un gen, cuyo identificador se encuentra a la derecha de la matriz; la columna de la izquierda se corresponden con los valores de FDR. Se considera un resultado significativo para los valores $FDR < 0,05$.

De los tres gráficos de análisis de expresión diferencial multiclases que se hicieron y fijándose únicamente en la expresión diferencial de genes entre los tres modelos animales, sólo se observaron diferencias de expresión génica significativas en el análisis donde se tomaban como clases los tres modelos de ratón, sin tener en cuenta la etapa de desarrollo (**Figura 38**). En esta matriz de colores se ve un claro patrón de expresión, los genes que se encuentran poco expresados (azul) en el modelo animal NMRI, están muy expresados en los modelos TyrTH e YRT2, y los que están muy expresados (rojo) en NMRI se expresan poco en los otros dos modelos. Por tanto, los ratones TyrTH (albinos, con las alteraciones visuales corregidas) e YRT2 (pigmentado) son muy similares, desde el punto de vista de expresión génica en el ojo/retina, tal y como cabía esperar según el fenotipo comparable visual que presentan.



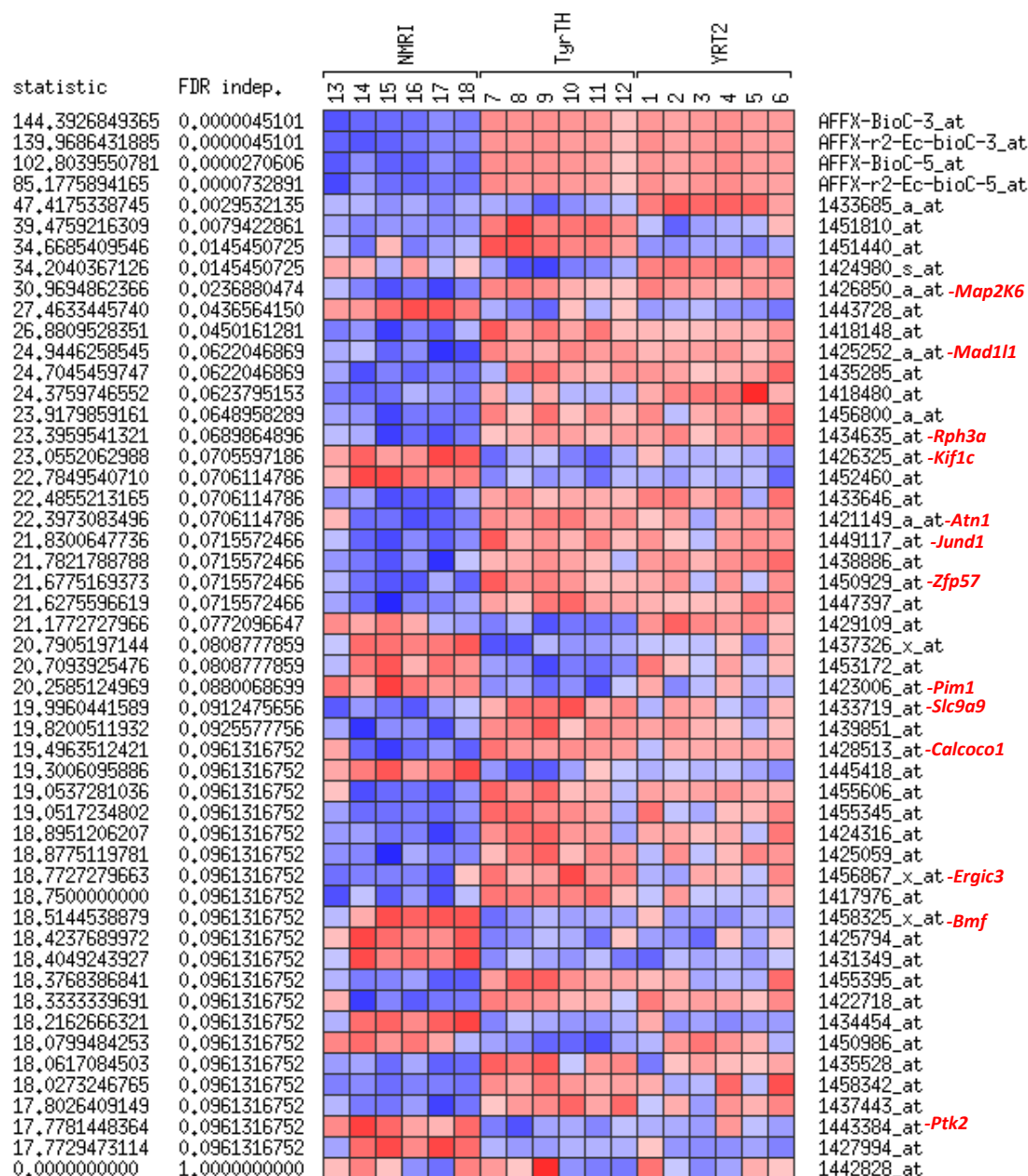


Figura 38. Gráfico de expresión diferencial **T-Rex** tomando como clases sólo los modelos animales (corchetes). Modelos animales por triplicado (1 al 18), códigos de los genes (_at), valores de FDR. Azul (sub-expresión) y rojo (sobre-expresión). Modelo utilizado para la selección de los genes candidatos ya que es el único que presenta expresión diferencial de genes entre los modelos animales (señalados en rojo).

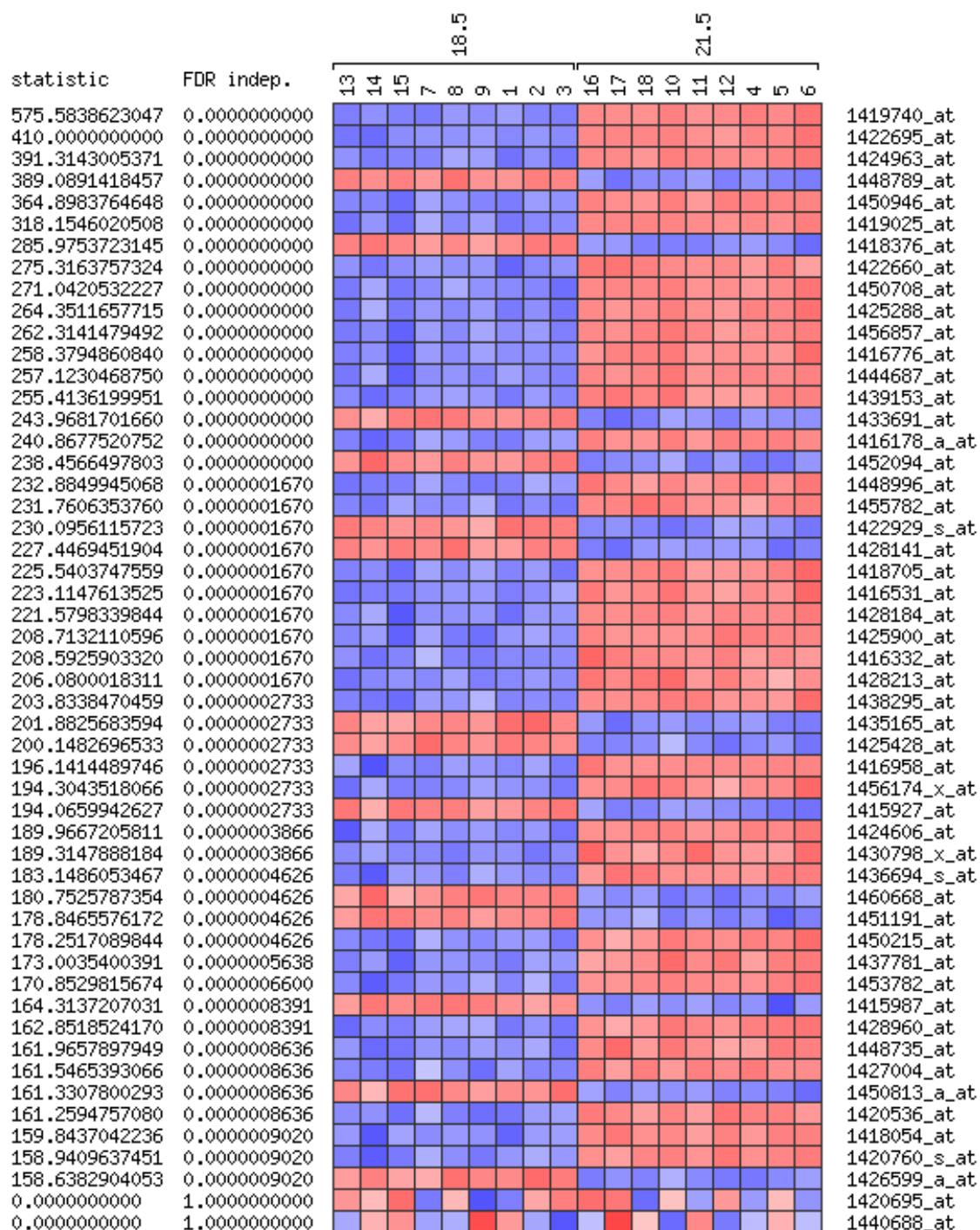


Figura 39. Gráfico de expresión diferencial T-Rex tomando como clases los estadios de desarrollo (corchetes). Modelos animales por triplicado (1 al 18), códigos de los genes (_at), valores de FDR. Azul (sub-expresión) y rojo (sobre-expresión).

Resultados

Del gráfico dónde se tomaban como clases los tres modelos de ratón, sin tener en cuenta la etapa de desarrollo (**Figura 38**), se seleccionaron los genes con FDR significativo ($< 0,05$). Con la nomenclatura ID de los genes dada por Affymetrix (por ejemplo 1416531_at), se obtuvo un listado con el nombre de los genes, proceso biológico en el que intervenían mediante el programa **Genecodis 2.0** (Carmona-Saez, 2007; Nogales-Cadenas, 2009) (**Figura 40**), detallando la función molecular de la que formaban parte y el componente celular al que pertenecían.



Figura 40. Anotaciones proceso biológico (Genecodis 2.0)

A partir de esos datos se documentó cada uno de los genes diferencialmente expresados con ayuda del *Entrez Pubmed* y se seleccionaron como genes candidatos aquellos que tenían relación con la función visual.

Al estudiar el gráfico de **GEPAS** de la **Figura 38** se observó que la muestra número 13 (primera columna) seguía un patrón de colores ligeramente diferente a sus otras dos réplicas. Con objeto de evitar posibles errores experimentales se decidió hacer un nuevo análisis descartándola (**Figura 41**). En ese gráfico seguían apareciendo muchos de los genes que ya se habían seleccionado y también otros relacionados con visión, que también fueron considerados como genes candidatos.

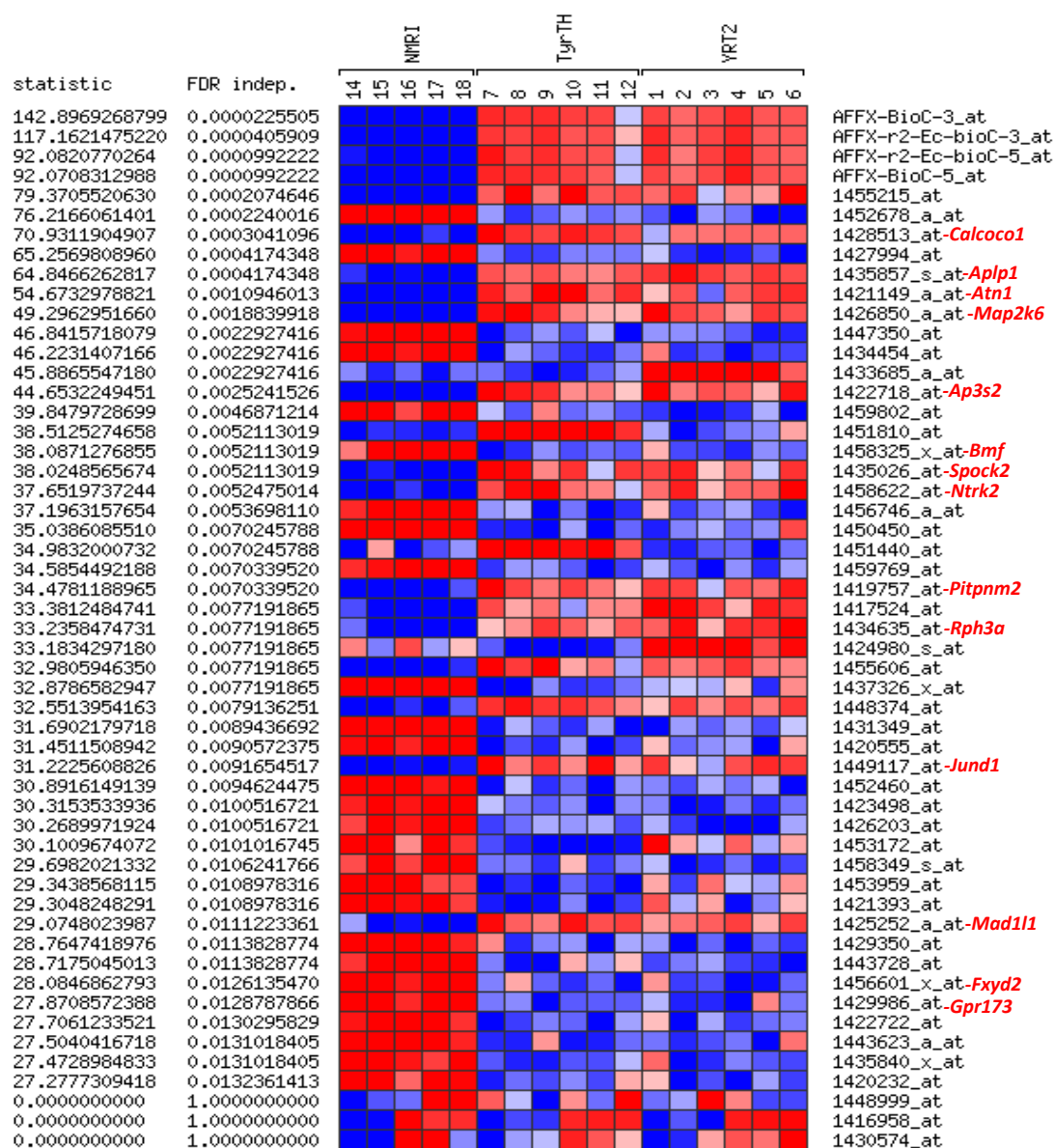


Figura 41. Gráfico de expresión diferencial T-Rex, sin el grupo 13 tomando como clases sólo los modelos animales (corchetes). Modelos animales por triplicado (1 al 18), códigos de los genes (_at), valores de FDR. Azul (sub-expresión) y rojo (sobre-expresión). Modelo utilizado para la selección de los genes candidatos ya que es el único que presenta expresión diferencial de genes entre los modelos animales (señalados en rojo).

En total, se analizaron 20 genes (Tabla XI) que según los análisis estadísticos de expresión diferencial estaban diferencialmente expresados en los tres modelos animales NMRI, YRT2 y TyrTH.

código ID	Gen	Símbolo	Descripción función
1426850_a_at	<i>Mitogen activated protein kinase kinase 6</i>	<i>Map2k6</i>	detiene el ciclo celular
1425252_a_at	<i>Mitotic arrest deficient 1-like 1</i>	<i>Mad11</i>	división celular, metafase
1434635_at	<i>Rabphilin 3A</i>	<i>Rph3a</i>	transporte vesículas presinápticas
1426325_at	<i>Kinesin family member 1C</i>	<i>Kif1c</i>	transporte retrógrado de vesículas al Golgi
1421149_a_at	<i>Atrophin 1</i>	<i>Atn1</i>	regulación negativa de la transcripción ARN
1449117_at	<i>Jun proto-oncogene related gene d1</i>	<i>Jund1</i>	regulación de la progresión del ciclo celular
1450929_at	<i>Zinc finger protein 57</i>	<i>Zfp57</i>	regulación negativa de la transcripción ARN
1423006_at	<i>Proviral integration site 1</i>	<i>Pim1</i>	proliferación celular
1433719_at	<i>Solute carrier family 9, isoform 9</i>	<i>Slc9a9</i>	transporte
1428513_at	<i>Calcium binding and coiled coil domain 1</i>	<i>Calcoco1</i>	regulación positiva de la transcripción ARN
1456867_x_at	<i>ERGIC and golgi 3</i>	<i>Ergic3</i>	transporte de vesículas del RE al Golgi
1458325_x_at	<i>Bcl2 modifying factor</i>	<i>Bmf</i>	regulación de la apoptosis
1443384_at	<i>PTK2 protein tyrosine kinase 2</i>	<i>Ptk2</i>	migración de neuronas
1435857_s_at	<i>Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1</i>	<i>Aplp1</i>	apoptosis, adhesión celular
1422718_at	<i>Adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit</i>	<i>Ap3s2</i>	transporte mediado por vesículas
1435026_at	<i>Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2</i>	<i>Spock2</i>	unión a calcio, matriz extracelular
1458622_at	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>	<i>Ntrk2</i>	desarrollo fotorreceptores tipo bastones
1419757_at	<i>Phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2</i>	<i>Pitpm2</i>	transporte
1456601_x_at	<i>FXD domain-containing ion transport regulator 2</i>	<i>Fxyd2</i>	transporte
1429986_at	<i>G-protein coupled receptor 173</i>	<i>Gpr173</i>	fototransducción

Tabla XI. Genes diferencialmente expresados. Código ID, símbolo y breve descripción de su función.

Para la interpretación funcional de los resultados se usó la aplicación informática **FatiScan** de **GEPAS**, con lo que se confirmó que la mayor parte de los genes que estaban diferencialmente expresados participaban en la percepción visual (**Figura 42**).

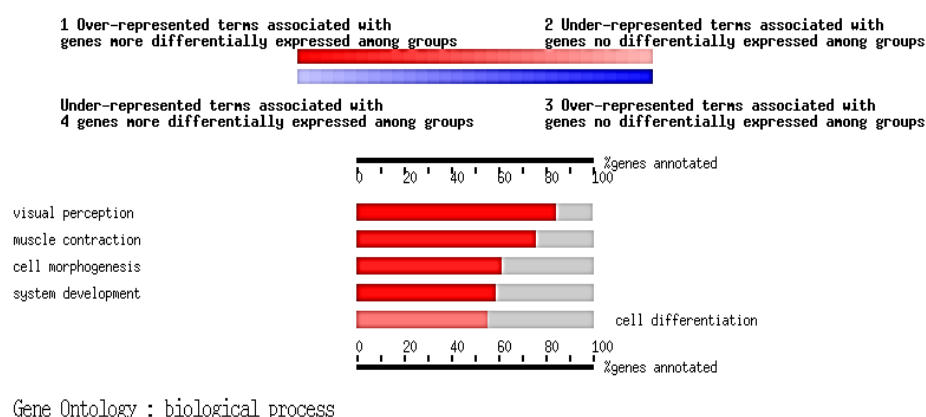


Figura 42. Gráfico **FatiScan** de **GEPAS** donde se hace una interpretación funcional de los resultados de expresión génica.

1.2. Validación de los genes candidatos por PCR a tiempo real

Para validar los resultados de los *microarrays*, se midió el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes candidatos por PCR a tiempo real, usando SYBRGREEN con cebadores específicos y análisis de los resultados por cuantificación relativa de los valores de Ct (curva patrón).

A partir de la secuencia codificante de cada gen, obtenida de Emsembl, y con ayuda del programa **Primer Express** se diseñaron los cebadores (**Tabla V**).

La reacción de PCR cuantitativa de cada gen se hizo con las 18 muestras de ADN copia para el gen problema y para el de referencia (β -actina). Además de cinco diluciones decrecientes (concentración conocida) de los dos genes para hacer la recta patrón. Y finalmente un control negativo de cada gen. Todo ello por duplicado.

Los valores de Ct obtenidos fueron convertidos en número de moléculas del gen problema respecto a 1000 moléculas de β -actina. Estos resultados se representaron en gráficas de barras con la desviación estándar correspondiente (**Figura 43, 44**).

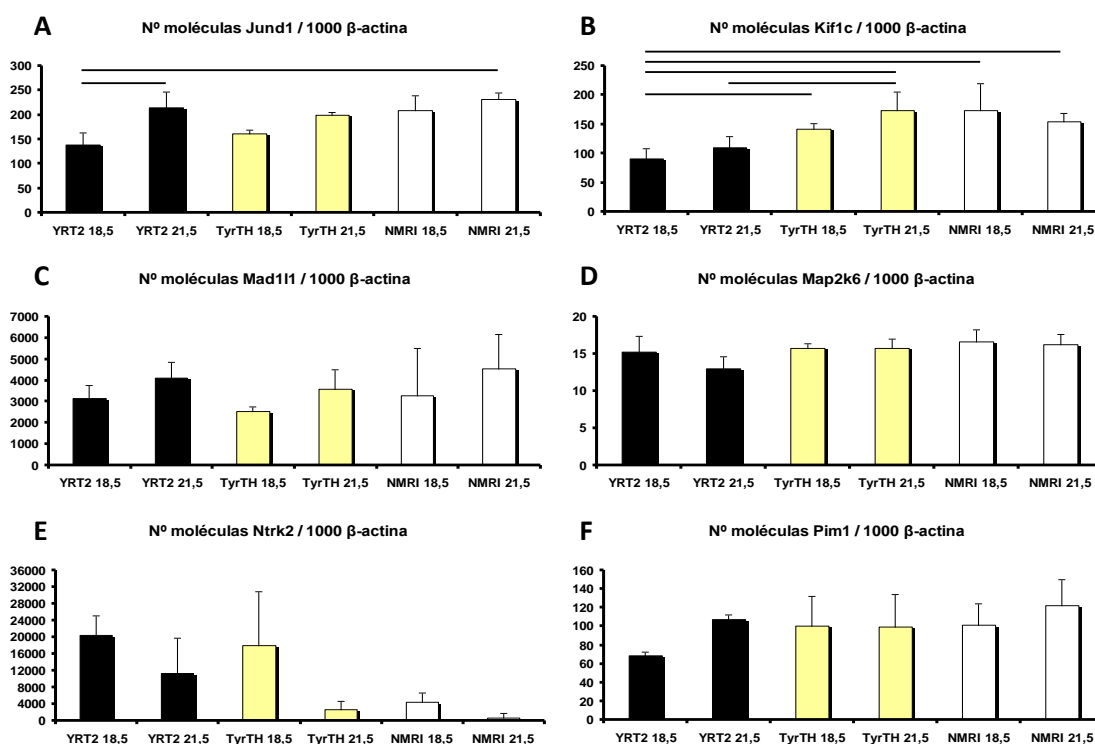


Figura 43. Representación resultados PCR cuantitativa. Barras horizontales señalan los grupos con diferencias significativas (test múltiple anova post-hoc con correlación Boncerroni). **A-** *Jund1*, **B-** *Kif1c*, **C-** *Mad11l*, **D-** *Map2k6*, **E-** *Ntrk2* y **F-** *Pim1*.

Resultados

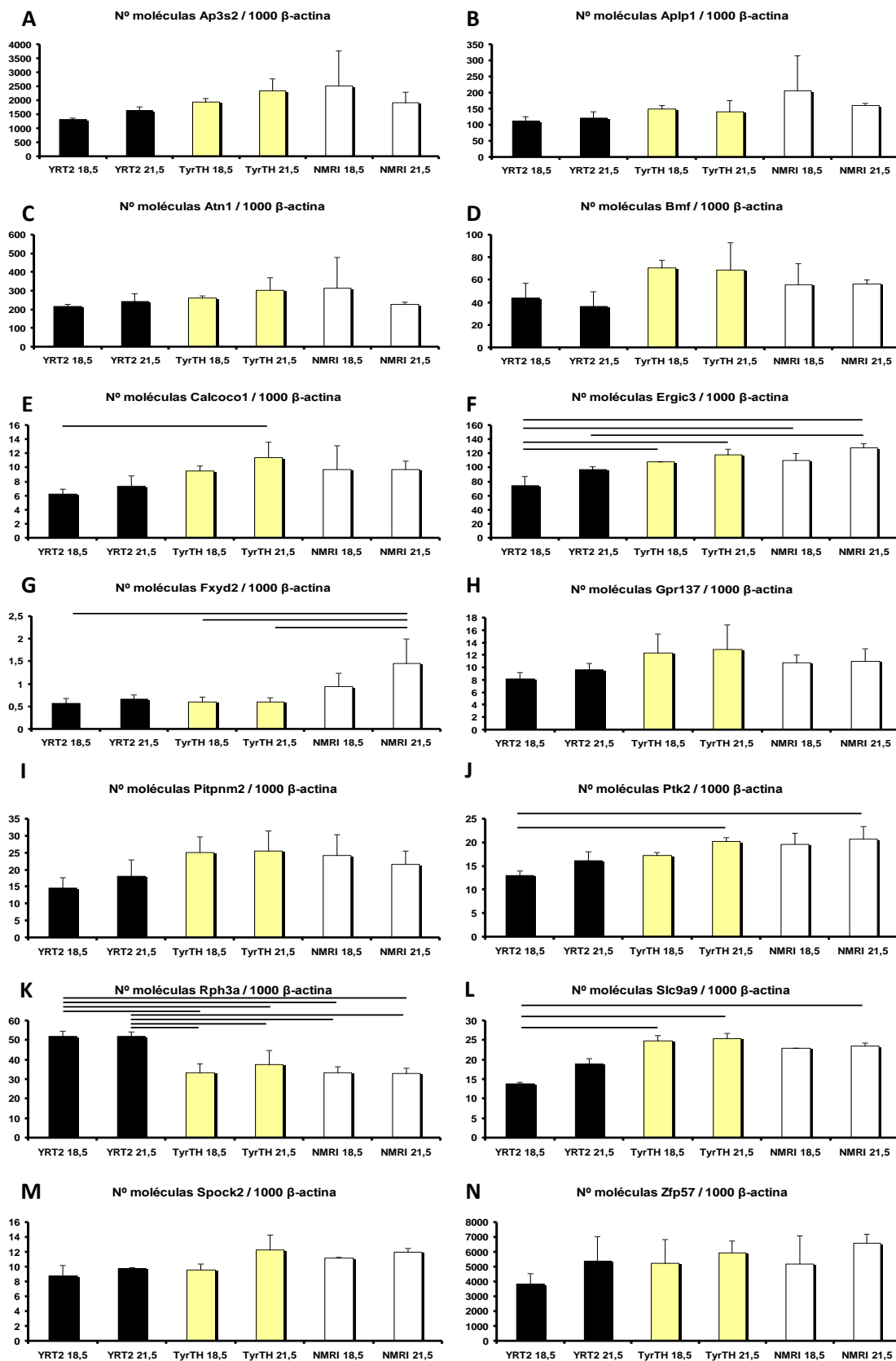


Figura 44 Resultados PCR cuantitativa. A- *Ap3s2*, B- *Aplp1*, C- *Atn1*, D- *Bmf*, E- *Calcoco1*, F- *Ergic3*, G- *Fxyd2*, H- *Gpr137*, I- *Pipnm2*, J- *Ptk2*, K- *Rph3a*, L- *Slc9a9*, M- *Spock2* y N- *Zfp57*.

Resultados

Se hizo un análisis estadístico de los resultados de las PCR cuantitativas; para ello se aplicó un test de comparación múltiple anova post-hoc con corrección de Bonferroni con un nivel de significancia del 5%. El establecimiento del corte entre significativo y no significativo fue fijado por un p valor <0,0033 dado por el programa estadístico (Tabla XII).

GEN	Valor P	Diferencias significativas
<i>Ap3s2</i>	0,0004	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Calcoco1</i>	0,0008	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Ergic3</i>	0,0003	YRT2 18,5 y TyrTH 18,5
<i>Ergic3</i>	~ 0	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Ergic3</i>	0,0002	YRT2 18,5 y NMRI 18,5
<i>Ergic3</i>	~ 0	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Ergic3</i>	0,0022	YRT2 21,5 y NMRI 21,5
<i>Fxyd2</i>	0,0018	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Fxyd2</i>	0,0023	TyrTH 18,5 y NMRI 21,5
<i>Fxyd2</i>	0,0023	TyrTH 21,5 y NMRI 21,5
<i>Jund1</i>	0,002	YRT2 18,5 y YRT2 21,5
<i>Jund1</i>	0,0015	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Kif1c</i>	0,0016	YRT2 18,5 y TyrTH 18,5
<i>Kif1c</i>	~ 0	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Kif1c</i>	0,0006	YRT2 18,5 y NMRI 18,5
<i>Kif1c</i>	0,0023	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Kif1c</i>	0,0004	YRT2 21,5 y TyrTH 21,5
<i>Pkt2</i>	0,0004	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Pkt2</i>	0,0002	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Rph3a</i>	0,0004	YRT2 18,5 y TyrTH 18,5
<i>Rph3a</i>	0,0026	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Rph3a</i>	0,0021	YRT2 18,5 y NMRI 18,5
<i>Rph3a</i>	0,0015	YRT2 18,5 y NMRI 21,5
<i>Rph3a</i>	0,0005	YRT2 21,5 y TyrTH 18,5
<i>Rph3a</i>	0,0026	YRT2 21,5 y TyrTH 21,5
<i>Rph3a</i>	0,0021	YRT2 21,5 y NMRI 18,5
<i>Rph3a</i>	0,0015	YRT2 21,5 y NMRI 21,5
<i>Slc9a9</i>	0,0017	YRT2 18,5 y TyrTH 18,5
<i>Slc9a9</i>	0,0004	YRT2 18,5 y TyrTH 21,5
<i>Slc9a9</i>	0,0014	YRT2 18,5 y NMRI 21,5

Tabla XII. Resultados de PCR cuantitativas con diferencias estadísticamente significativas.

Teniendo en cuenta el patrón de expresión génica obtenido en el gráfico de **GEPAS** (**Figura 38**), donde se observa un patrón de expresión similar para los ratones TyrTH e YRT2 y opuesto al patrón de los ratones NMRI, los resultados de las PCR cuantitativas tendrían que ser similares a éstos, es decir, el número de moléculas de los genes candidatos en los ratones TyrTH e YRT2 tendrían que ser similares y a su vez diferentes al número de moléculas de los genes en los ratones NMRI.

Los gráficos de PCR cuantitativa (**Figuras 43 y 44**) no reflejaron, en la mayoría de los casos, el patrón esperado. Además muchas de las diferencias de expresión encontradas no fueron estadísticamente significativas, tal y como inicialmente habían sido reflejadas en los análisis realizados por **FIESTA** (**Figura 35**), mientras que en otros casos sí se pudo detectar diferencias significativas (**Tabla XII**).

1.3. Validación de los genes candidatos por Inmunohistoquímica

Con objeto de comprobar si era posible ver diferencias a nivel de proteínas, se hicieron ensayos inmunohistoquímicos en cortes de criostato de ratones NMRI, YRT2 y TyrTH de 18,5 y 21,5 d.p.c para comprobar si había expresión diferencial a nivel de proteína. Se utilizaron cortes de retina de un ratón C57BL/6 (fenotipo pigmentado silvestre) como control del buen funcionamiento de los anticuerpos.

Partiendo de la información sobre la función, el proceso biológico y el componente celular de los genes con expresión diferencial (con FDR significativo), obtenidos con los análisis de expresión génica con **GEPAS** y de los anticuerpos comerciales existentes, se seleccionaron para su validación los siguientes genes: *Spock2*, *Rph3a*, *Fxyd2*, *Mkk6/Map2k6*, *Bmf*, *Slc9a9* y *TrkB/Ntrk2* (**Figuras 45–47, 49, 51–53**).

También se probó la validación de los genes *Pten* y *Bassoon* (seleccionados con **FIESTA**), con valores de FDR no significativos pero muy próximos a 0,05 (**Figuras 48 y 50**) y que según la información dada por el programa, participan en desarrollo y diferenciación celular; por lo que podrían ser buenos genes candidatos.

De los resultados obtenidos al hacer todos los ensayos inmunohistoquímicos, no se pudo observar un marcaje diferencial de los anticuerpos en ninguno de los cortes de las retinas experimentales; sin embargo los anticuerpos funcionaron perfectamente en los cortes de los ratones control, por lo que parece ser que la diferencia de expresión observada a nivel de genes no se reflejaba a nivel de expresión de proteínas. Adicionalmente también podría ser que el nivel de expresión y cantidad de estas proteínas durante el desarrollo fuera sensiblemente menor que en la etapa adulta.

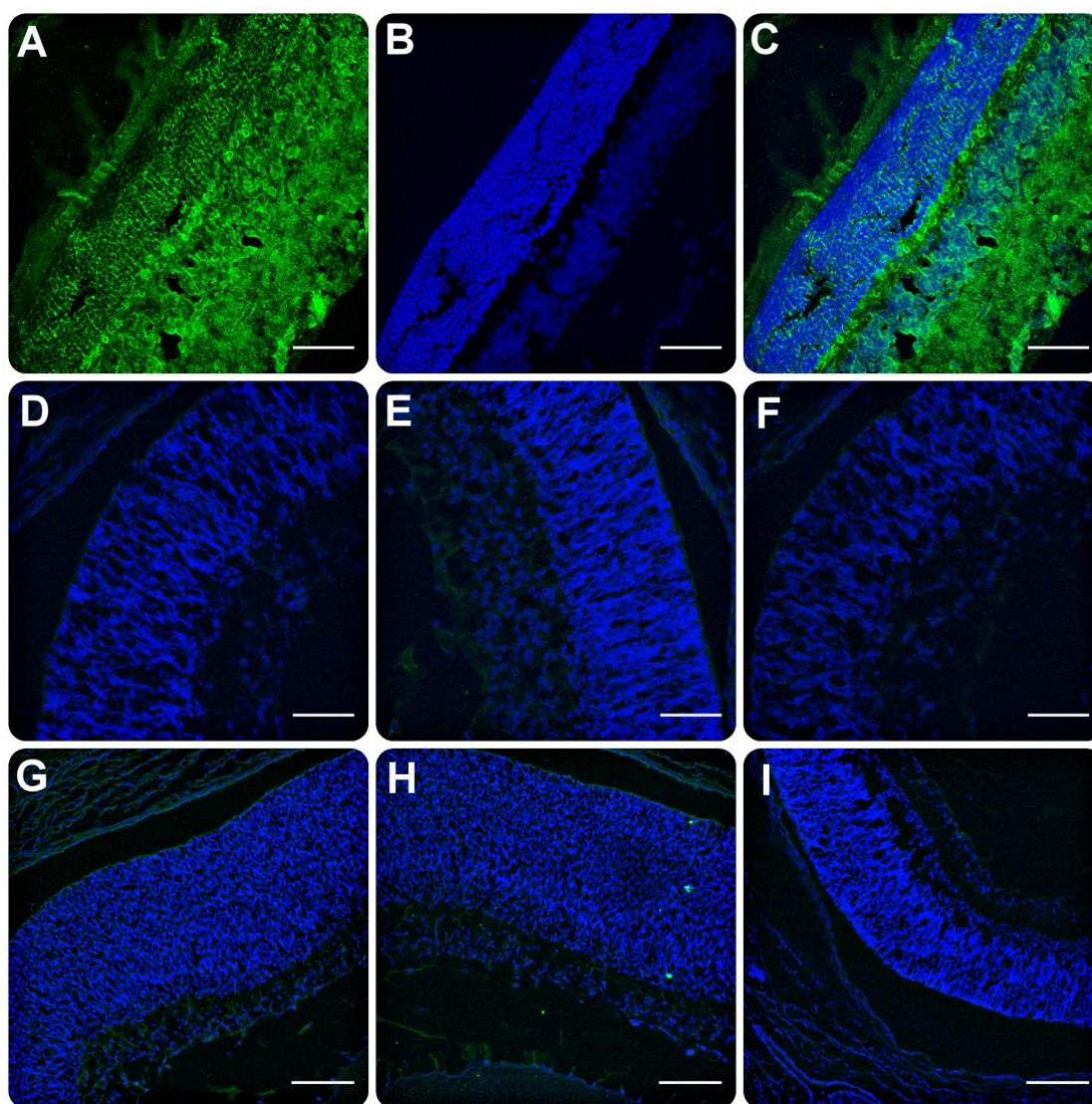


Figura 45. Inmunohistoquímica de Spock2 (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 100 μ m (G-I).

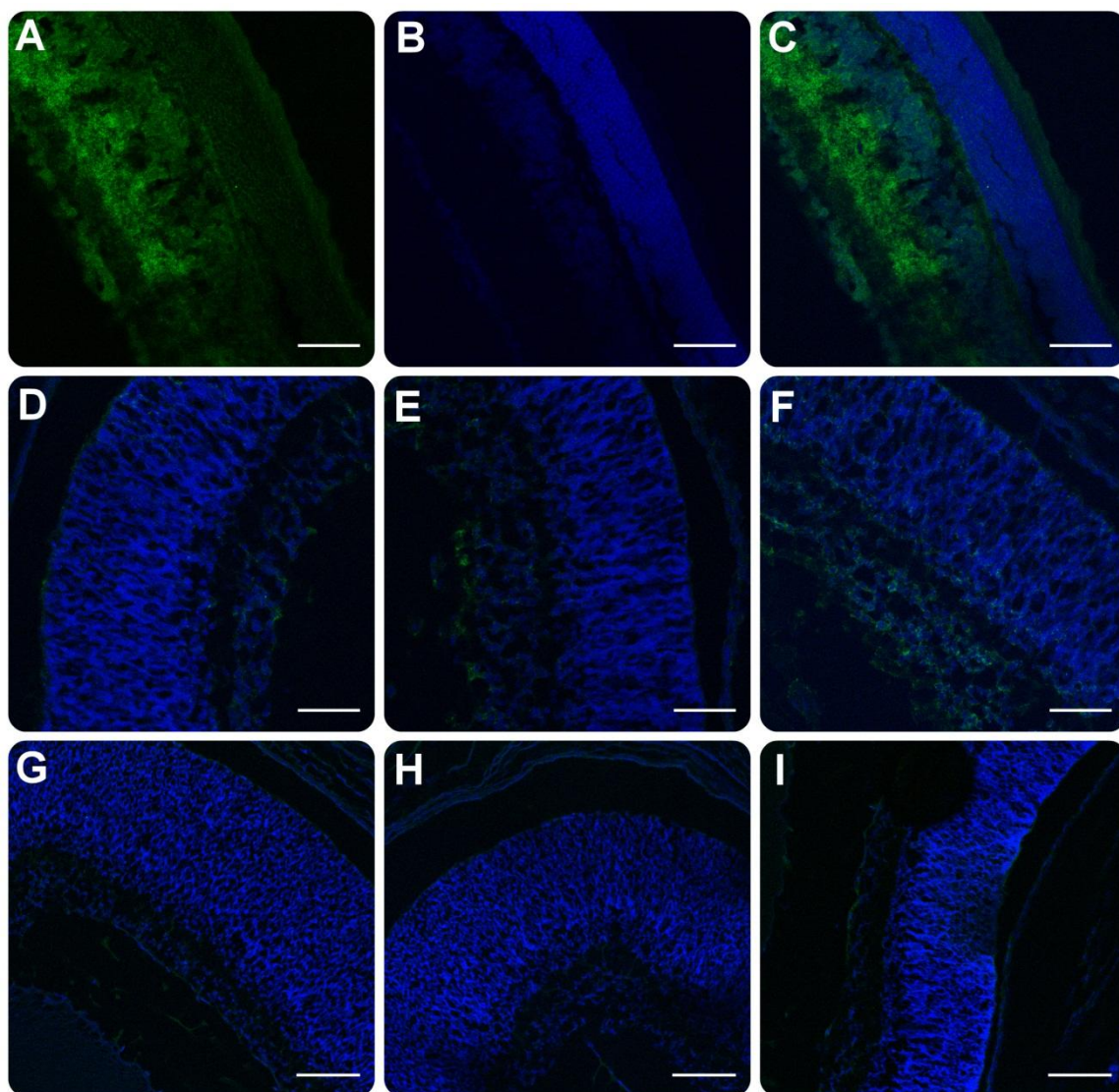


Figura 46. Inmunohistoquímica de Rph3A (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μm (A-F) y 100 μm (G-I).

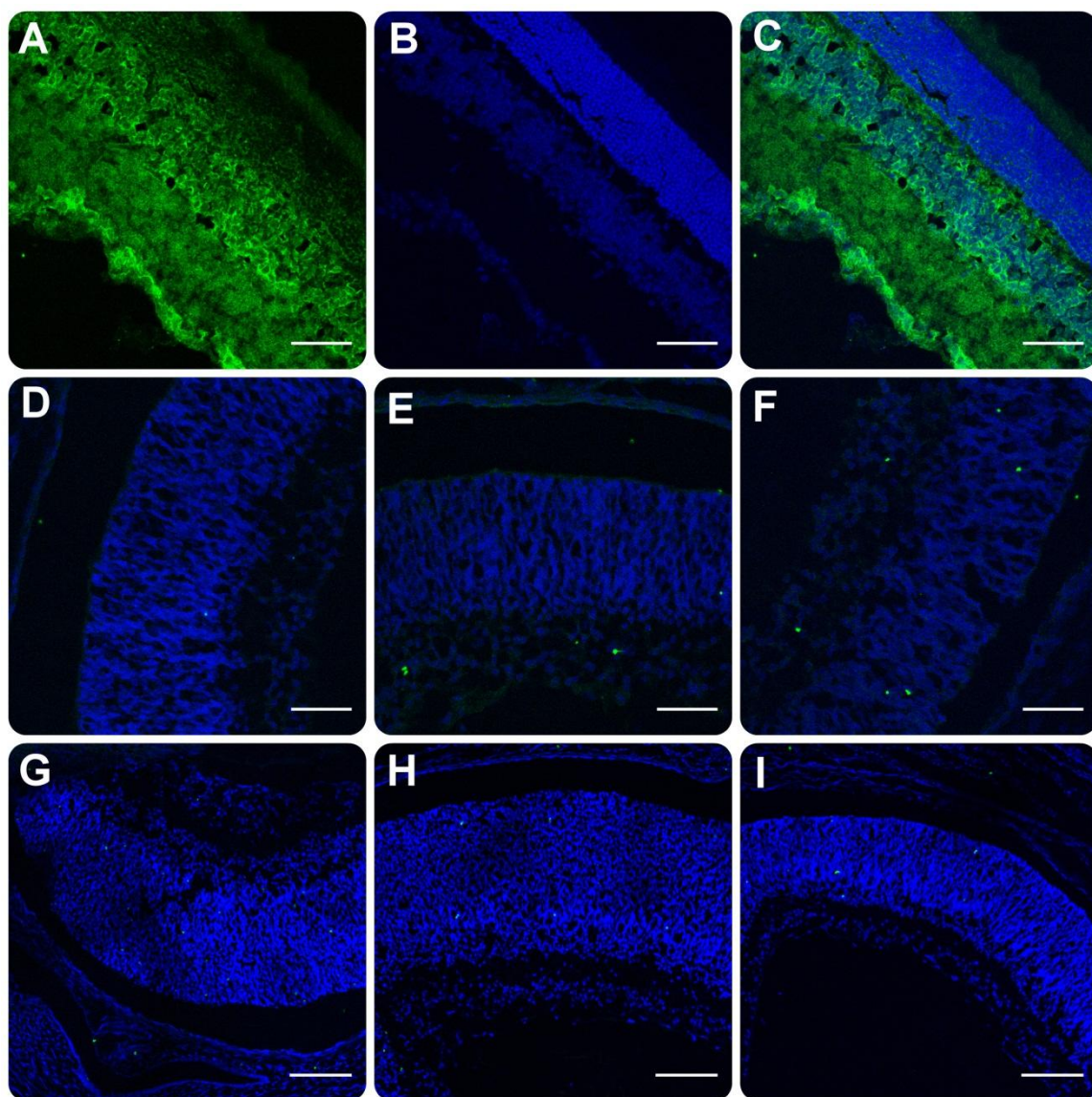


Figura 47. Inmunohistoquímica de Fxyd2 (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI(G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 100 μ m (G-I).

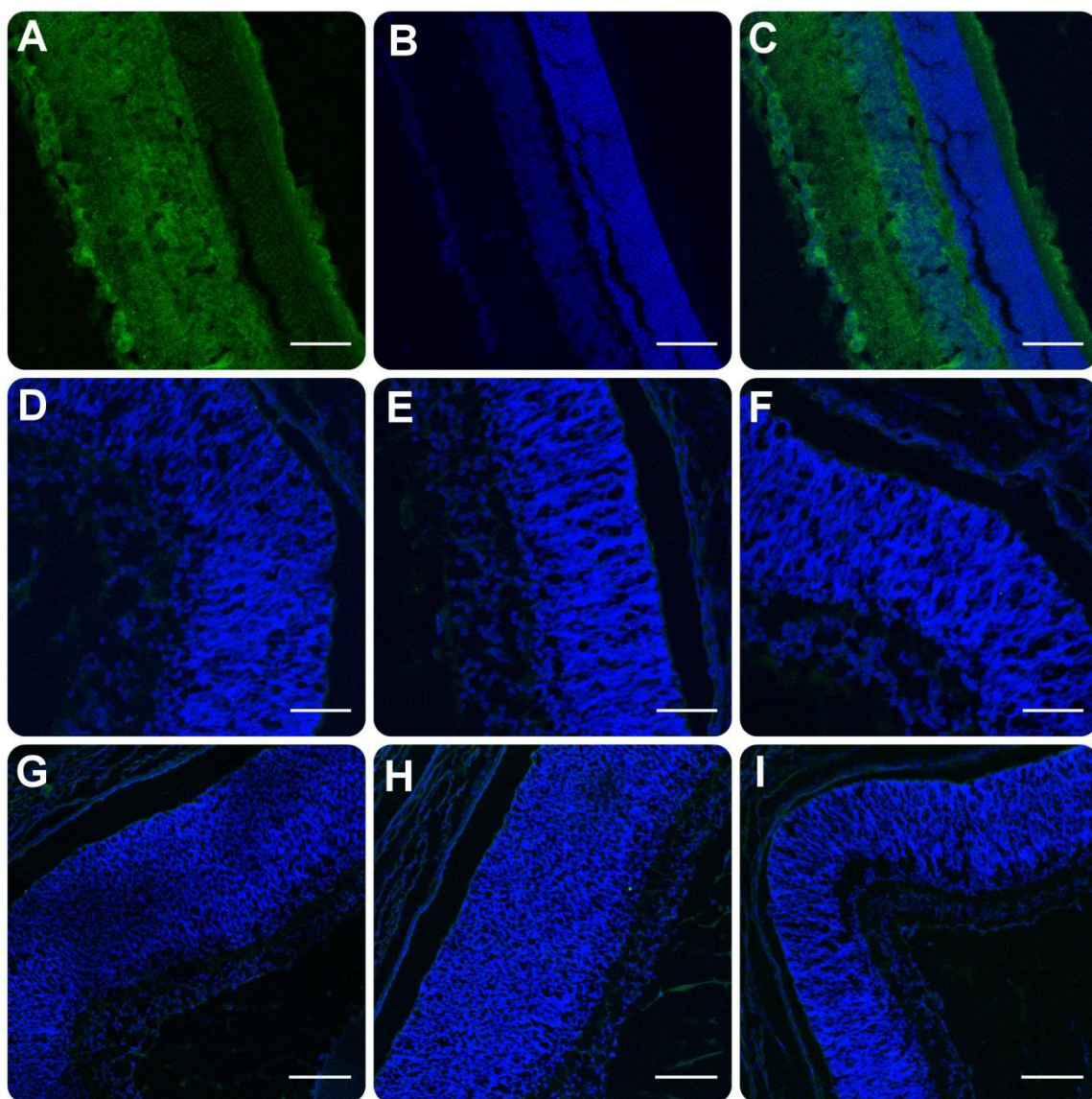


Figura 48. Inmunohistoquímica de Pten (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μm (A-F) y 100 μm (G-I).

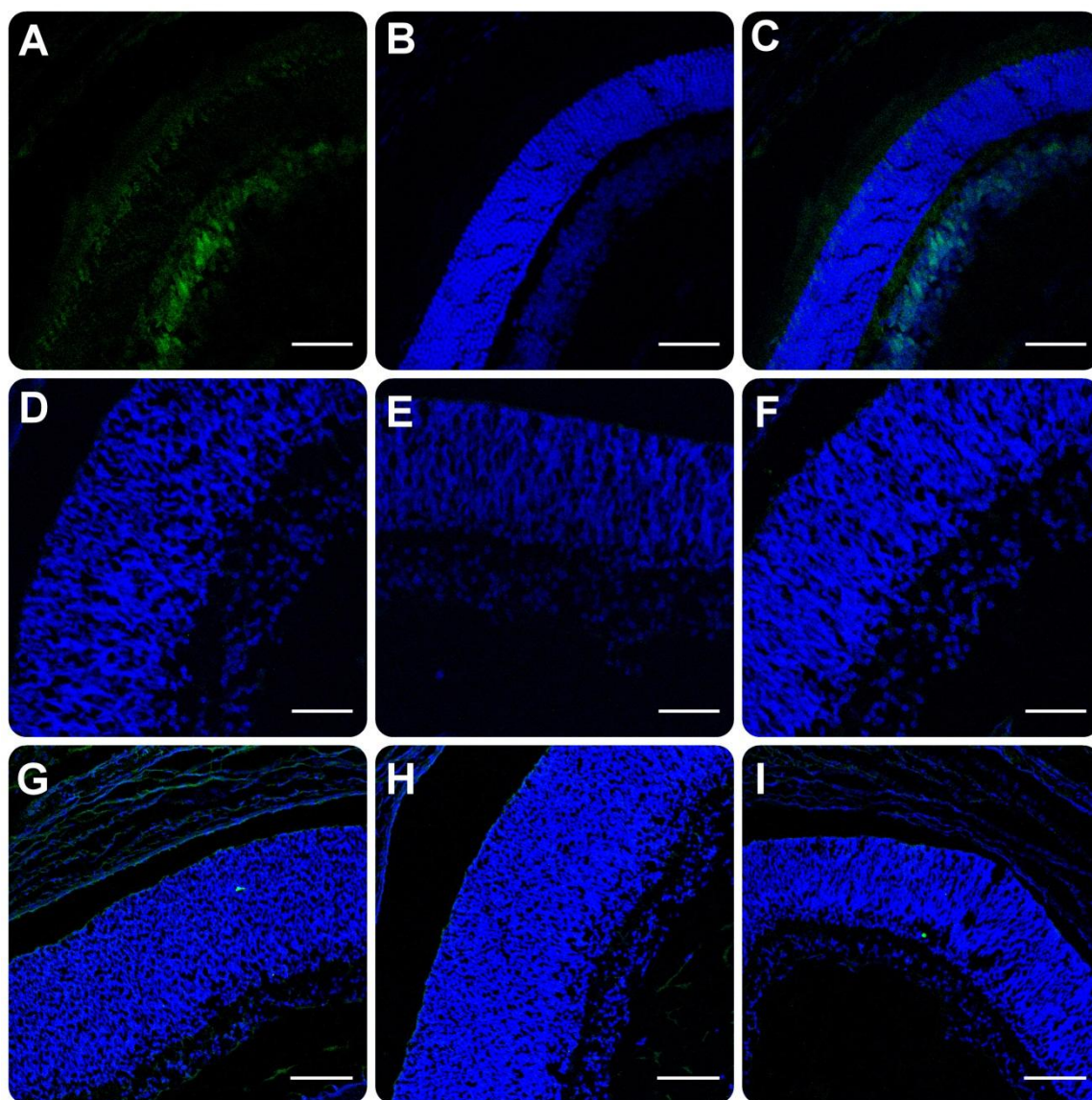


Figura 49. Inmunohistoquímica de Mkk6 (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μm (A-F) y 100 μm (G-I).

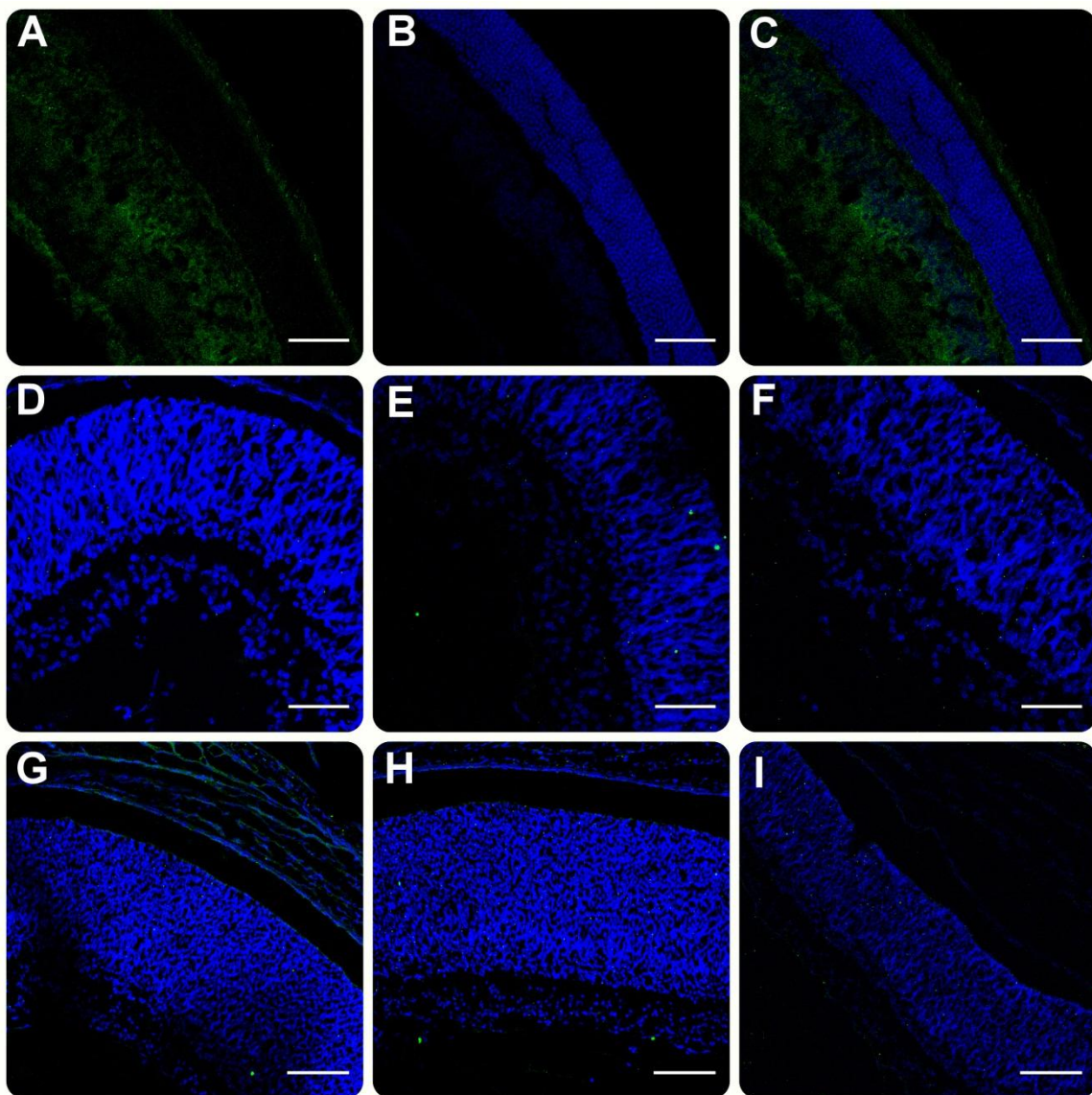


Figura 50. Inmunohistoquímica de Bassoon (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 100 μ m (G-I).

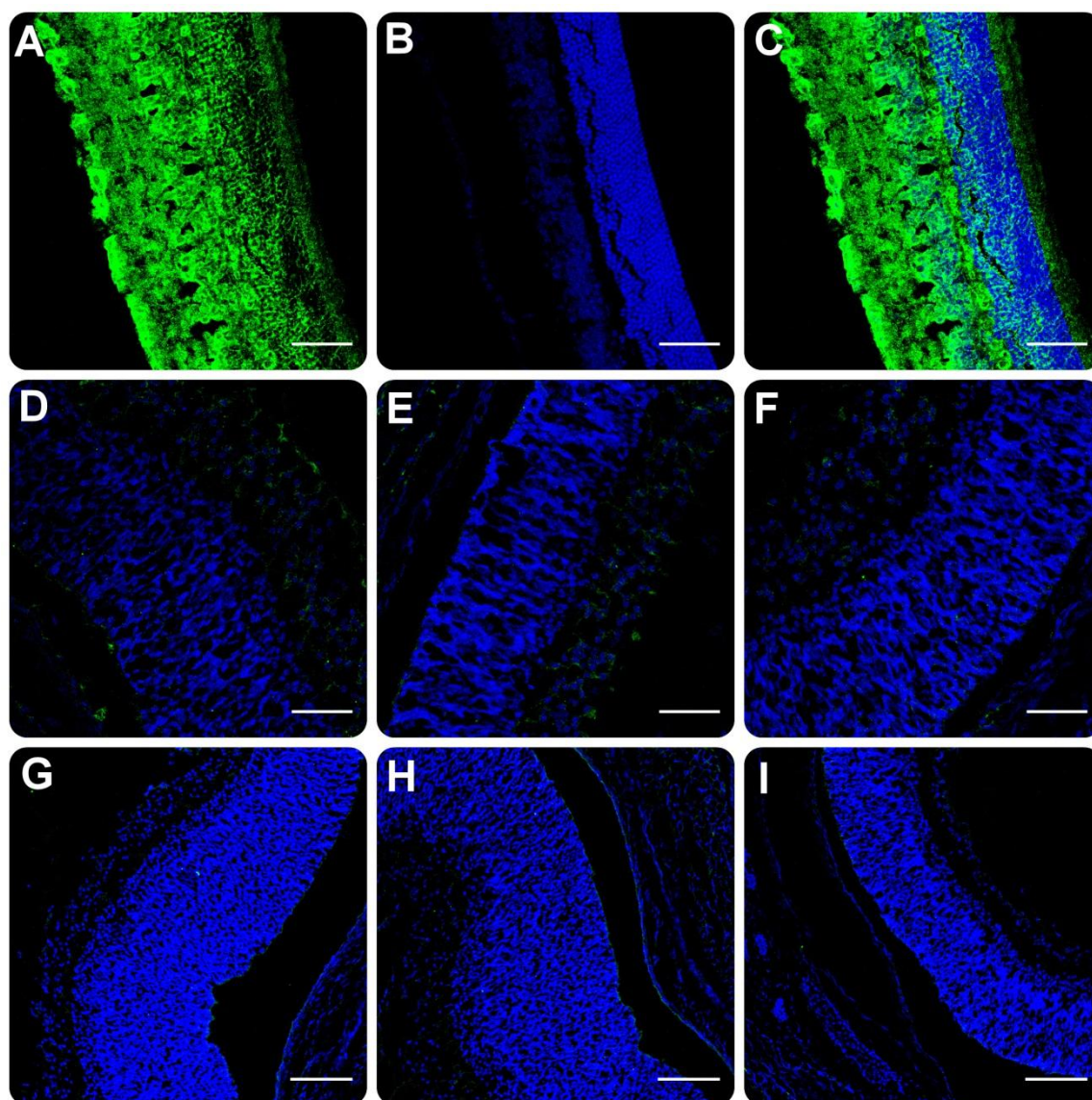


Figura 51. Inmunohistoquímica de Bmf (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (**A**), proyección para el canal del azul (**B**) y superposición de las dos proyecciones (**C**). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (**D**), TyrTH (**E**) e YRT2 (**F**). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (**G**), TyrTH (**H**) e YRT2 (**I**). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 100 μ m (G-I).

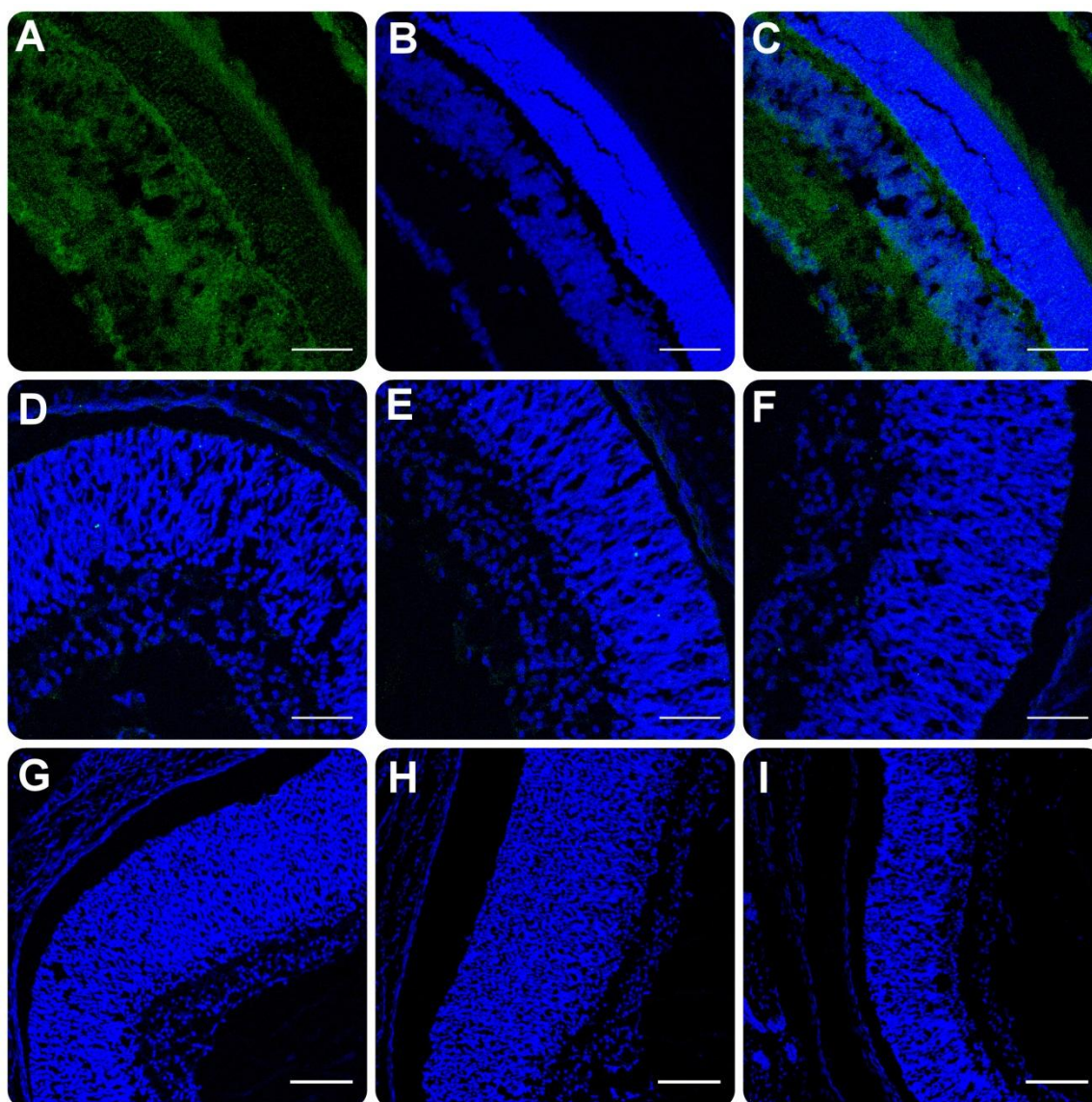


Figura 52. Inmunohistoquímica de Slc9a9 (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μm (A-F) y 100 μm (G-I).

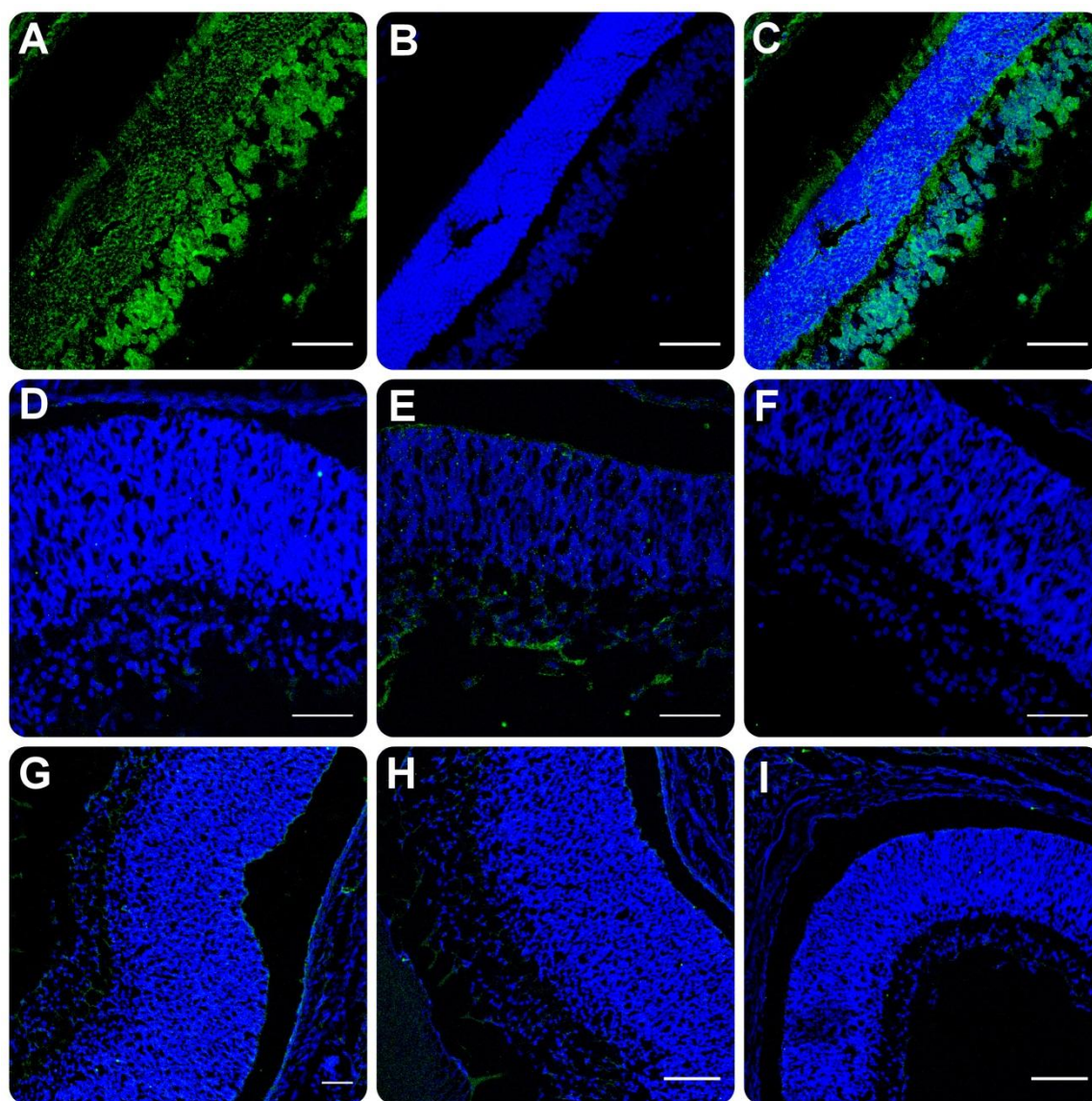


Figura 53. Inmunohistoquímica de Ntrk2 (anticuerpo marcado en verde y núcleos en azul). Control positivo (retina adulta C57Bl/6): proyección para el canal del verde (A), proyección para el canal del azul (B) y superposición de las dos proyecciones (C). Superposiciones de las retinas de 18,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (D), TyrTH (E) e YRT2 (F). Superposiciones de las retinas de 21,5 d.p.c: HsdWin:NMRI (G), TyrTH (H) e YRT2 (I). Barra de escala: 50 μ m (A-F) y 100 μ m (G-I).

2. ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIOS MODELOS DE ALBINISMO

De manera paralela a los estudios de expresión génica se hicieron los estudios estructurales y funcionales de la retina en ratones NMRI, YRT2 y TyrTH.

2.1. Cuantificación del número de conos en retinas de ratones NMRI y TyrTH

Estudios preliminares de electrorretinografía, mediante ERGs, realizados en colaboración con el Prof. Pedro de la Villa y posteriormente confirmados mediante inmunohistoquímica, sugerían que las retinas de los ratones transgénicos TyrTH podían tener menos conos (**Figura 54**).

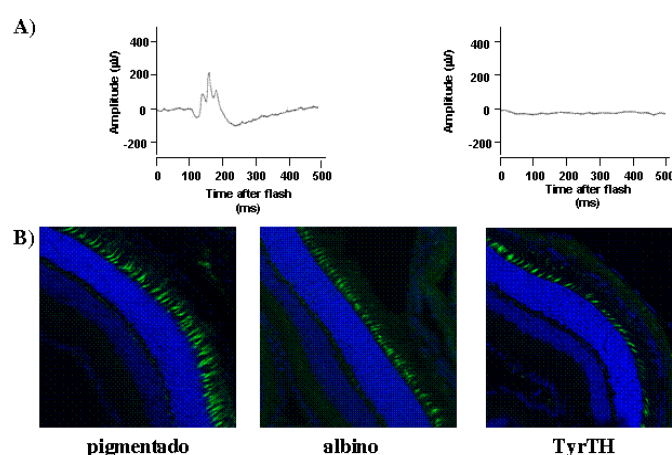


Figura 54. Estudios de los fotorreceptores tipo cono. **A-** Análisis electrofisiológico, respuesta a conos: el primero representa un diagrama de respuesta normal a conos (ratón pigmentado y albino) y el segundo diagrama una respuesta nula a conos (ratón transgénico TyrTH). **B-** Cortes histológicos de retina de un ratón pigmentado, albino y transgénico TyrTH, donde los segmentos externos de los conos están marcados con lectina (verde) y los núcleos celulares con Topro-3 (azul).

Para confirmar estas observaciones, se hizo un primer experimento que consistió en cuantificar el número de conos de 4 zonas equidistantes de la retina central de ratones NMRI y transgénicos TyrTH y calcular la distancia de la zona de conteo al nervio óptico. Para ello se hicieron preparaciones de retinas enteras de 14 ratones TyrTH y 17 ratones NMRI. Una vez fijadas y extraídas las retinas se marcaron los segmentos externos de los conos con lectina. A continuación, se tomaron imágenes de campo claro de las retinas enteras con un objetivo de 2,5x y con un accesorio del microscopio que permitía superponer una cuadrícula de dimensiones conocidas (formada por 10x10 cuadrados de 100 μm de lado cada uno). Estas imágenes sirvieron de guía para localizar las zonas de conteo. Finalmente se tomaron 4 imágenes equidistantes al nervio con el microscopio de fluorescencia y un objetivo 40x. Estas imágenes también se hicieron con la cuadrícula para poder tener delimitada la zona de conteo. Con el programa *ImageTool*

Resultados

se contaron los conos marcados de cada zona (cuadrícula) y se midió su distancia al nervio a partir de las imágenes de 2,5x.

Para calcular la distancia al nervio se tuvo en cuenta el factor de amplificación de objetivo (2,5x) y del ocular (2x), por lo tanto la arista de un cuadrado de la cuadrícula de 100 μm equivale a 500 μm (**Figura 55 y 56**).

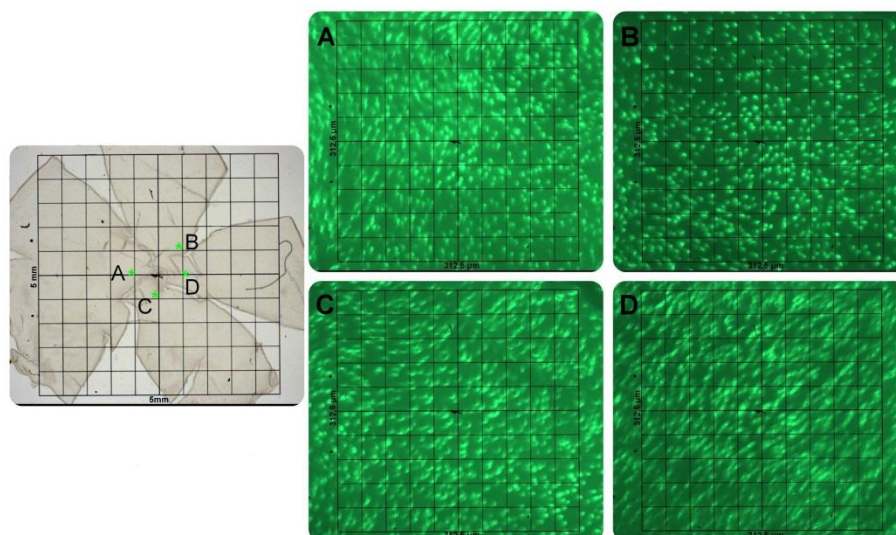


Figura 55. Preparaciones histológicas de retina de un ratón NMRI. Imágenes tomadas en campo claro con objetivo de 2,5x. Imágenes de fluorescencia con objetivo de 40x.

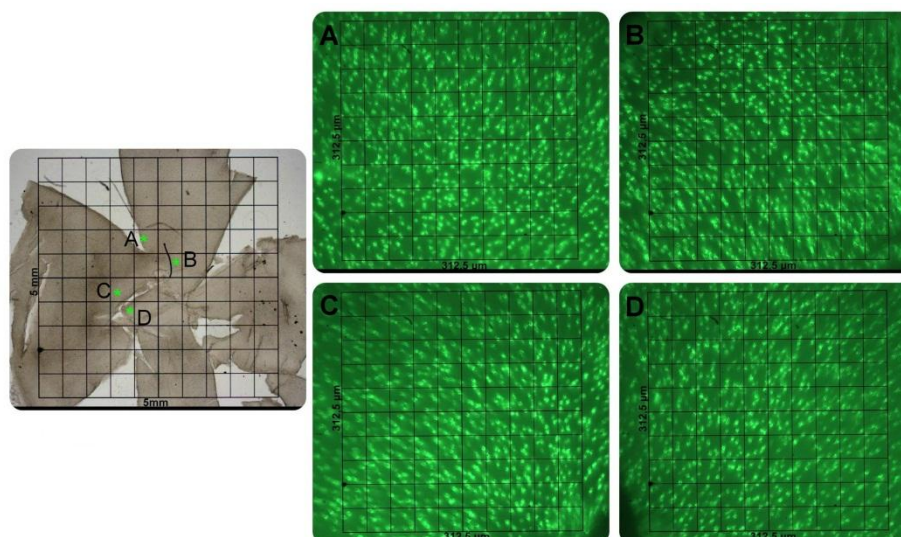


Figura 56. Preparaciones histológicas de retina de un ratón TyrTH. Imágenes tomadas en campo claro con objetivo de 2,5x. Imágenes de fluorescencia con objetivo de 40x.

RATÓN TyTH	zona A		zona B		zona C		zona D	
	conos	dist.mm	conos	dist.mm	conos	dist.mm	conos	dist.mm
2847	540	361,1	493	472,2	480	416,7	404	638,9
2843	491	722,2	495	611,1	525	472,2	517	500
2845	431	666,7	408	527,8	371	388,9	338	750
2872	358	1055,5	300	1111,1	392	1000	343	1416,7
2880	335	1222	332	916,7	296	1055,6	232	1111,1
2816	365	388,9	375	805,6	362	805,6	374	1000
2833	512	722,2	536	666,7	537	944,4	489	1222
2834/2	347	666,7	382	916,7	301	1166,7	284	1055,6
2835	330	638,9	453	777,8	399	611,1	379	555,6
2836	376	888,9	348	750	415	694,4	345	555,6
2837	473	722,2	497	638,9	429	777,8	408	444,4
2839	585	638,9	517	944,4	568	805,5	628	555,6
2857	409	1111,1	383	1166,7	395	1416,7	388	1195,4
3032	322	722,2	329	972,2	275	1083,3	245	1000
RATÓN NMRI	zona A		zona B		zona C		zona D	
	conos	dist.mm	conos	dist.mm	conos	dist.mm	conos	dist.mm
3017	510	916,67	547	527,77	552	444,44	512	666,67
3018	453	916,67	432	722,22	443	472,22	430	694,44
2877	449	638,89	459	555,55	508	361,1	399	750
2879	433	333,33	396	416,66	443	722,22	493	833,33
3011	463	1111,1	465	972,22	455	805,55	359	888,89
2873	401	750	420	694,44	381	416,67	408	888,89
2886	434	861,11	357	861,11	315	1444,44	499	1083,33
3020	645	861,11	563	888,88	537	1361,11	493	694,44
3021	398	611,11	391	638,88	372	1250	393	1138,88
2863	464	1083,33	462	1416,66	507	1416,66	548	1833,33
2869	316	1055,56	286	972,22	366	1250	351	1722,22
2874	562	638,88	457	638,88	490	1000	494	1583,33
2884_2	355	722,22	305	1416,66	395	500	425	1416,66
2888	277	1138,88	288	1083,33	257	805,55	379	1055,55
2889	335	1305,56	295	1416,66	430	1361,11	421	1666,66
3026	426	1333,3	393	1055,56	430	944,44	356	1222,22
3027	342	805,55	363	1444,44	430	1305,55	486	1500

Tabla XIII. Contajes de los conos de las retinas de ratones TyrTH y NMRI, en las distintas zonas (A, B, C y D) y teniendo en cuenta distancia al nervio en milímetros (dist. mm).

Con el número de conos y la distancia al nervio óptico de cada zona de conteo se calculó una recta de regresión para cada modelo animal. Para ello se representó el número de conos con respecto a la distancia al nervio y se determinó la pendiente de las rectas (**Figura 57**). Estos resultados mostraban una ligera tendencia, en los ratones TyrTH, a un menor número de conos con respecto a la distancia al nervio que en los ratones NMRI, es decir, que a igual distancia hay una mayor pendiente negativa en los ratones TyrTH y por lo tanto menor número de conos.

Sin embargo, los resultados obtenidos no son significativos, ya que los valores del coeficiente de regresión lineal (R^2) de las rectas no son próximos a 1, sino a 0. Existe una máxima dispersión, es decir, una máxima variabilidad en estos contajes.

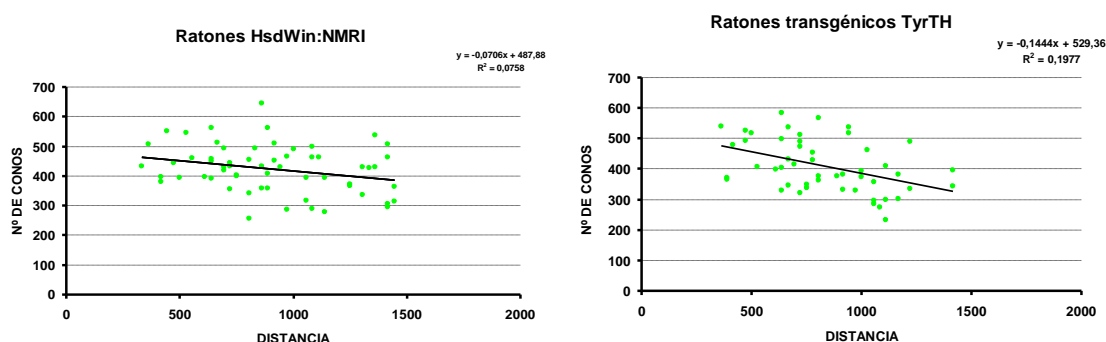


Figura 57. Gráficos de la recta de regresión. Se representa el número de conos de cada una de las zonas (A, B, C y D) por la distancia al nervio óptico.

2.2. Análisis electrofisiológico de ratones NMRI, YRT2 y TyrTH

Ante la gran variabilidad de los resultados obtenidos, se decidió hacer nuevos análisis electrofisiológicos; análisis realizados por el Prof. Pedro de la Villa en la Universidad de Alcalá de Henares. Se evaluaron tres modelos animales, NMRI, TyrTH e YRT2 (ambos en fondo genético NMRI) como control positivo (ratones pigmentados). Se hicieron electroretinogramas a un total de 45 ratones, de ellos el 50% de los NMRI, el 55% de los TyrTH y el 23% YRT2 presentaban un fenotipo de conos negativo, *coneless* (denominación dada en la presente tesis para referirse al fenotipo electroretinográfico de respuesta a conos nulo) (**Tabla XIV**).

Genotipo de ratón	Animales analizados	Individuos con ERG <i>coneless</i>
NMRI	12	6 (50%)
TyrTH	20	11 (55%)
YRT2	13	3 (23%)

Tabla XIV. Resultados de los electroretinogramas de respuesta a conos. NMRI, ratones albinos no consanguíneos y TyrTH e YRT2, ratones transgénicos en fondo genético NMRI.

La presencia del fenotipo *coneless*, relativamente frecuente en los tres modelos animales, hizo pensar que este fenotipo no estaba relacionado con la presencia o ausencia del transgén TyrTH sino que era una mutación que segregaba en la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI comerciales. Los ratones NMRI usados en los experimentos fueron los provenientes del proveedor comercial (HsdWin:NMRI) y los ratones transgénicos TyrTH e YRT2 fueron producidos y mantenidos en fondo genético HsdWin:NMRI; por este motivo el fenotipo *coneless* estaba presente en los tres grupos de animales.

2.3. Cuantificación del número de conos en retinas de ratones de la colonia no consanguínea HsdWin:NMRI

De los 45 electrorretinogramas hechos se seleccionaron 4 ratones con los ERGs de respuesta a conos muy dispares, sin tener en cuenta la presencia/ausencia de alguno de los transgenes pero si teniendo claro que todos ellos estaban en fondo genético HsdWin:NMRI. Los ratones seleccionados fueron los siguientes (**Figuras 58 y 59**): 6132, 6137 y 6344 con fenotipo *coneless*/afectado y 6237 con fenotipo normal.

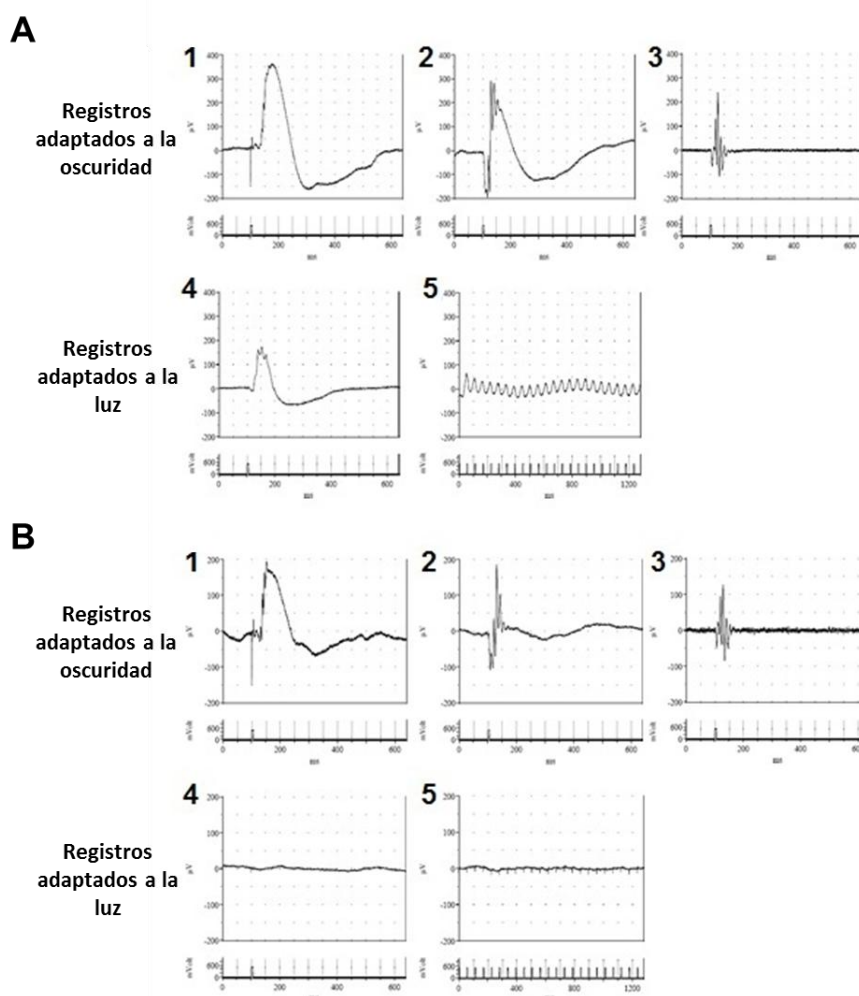


Figura 58. Resultados de los electrorretinogramas: **A-** ratón transgénico YRT2 (6237) y **B-** ratón HsdWin:NMRI (6137). 1- sensibilidad a bastones, 2- respuesta mixta máxima de conos y bastones, 3- potenciales oscilatorios, 4- respuesta de conos a un flash de luz 5- respuesta a estímulos repetidos (*flicker*).

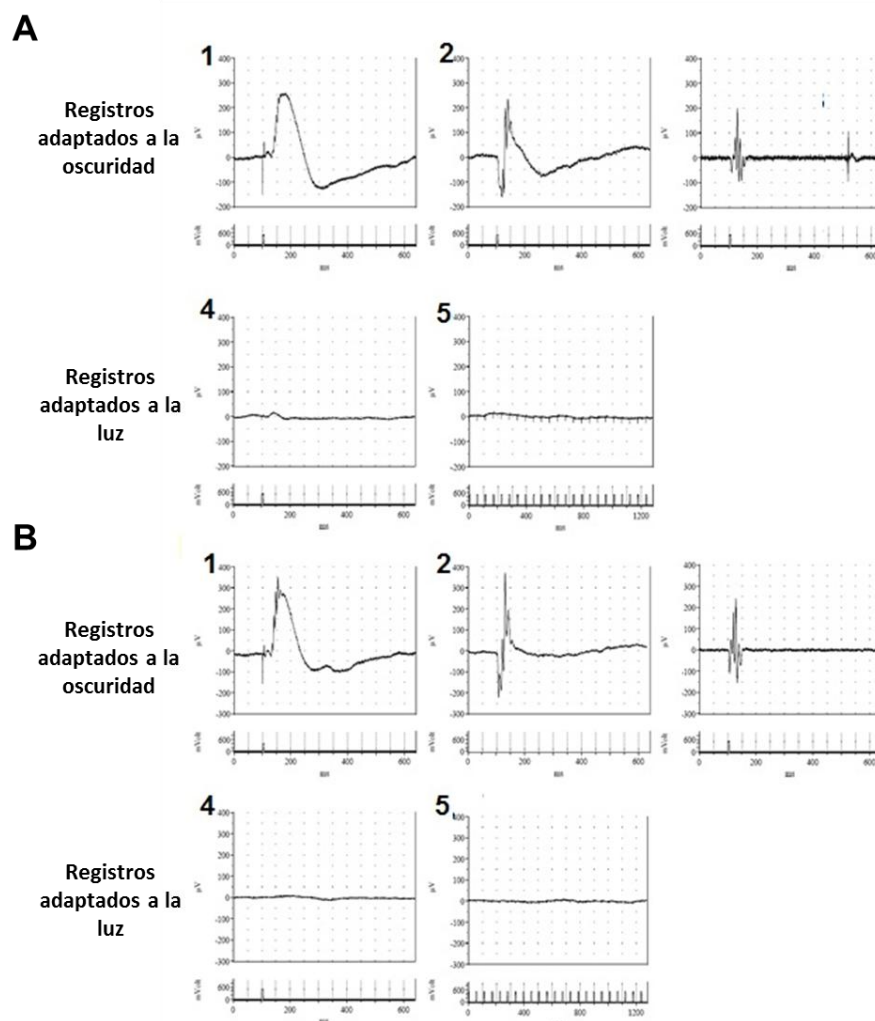


Figura 59. Resultados de los electrórretinogramas: **A-** ratón transgénico YRT2 (6244) y **B-** ratón HsdWin:NMRI (6132). 1- sensibilidad a bastones, 2- respuesta mixta máxima de conos y bastones, 3- potenciales oscilatorios, 4- respuesta de conos a un flash de luz 5- respuesta a estímulos repetidos (*flicker*).

Con estos 4 ratones, previamente analizados por ERG, se hizo el análisis cuantitativo del número de conos de sus retinas, mediante histología e inmunohistoquímica, aumentando el número de zonas de conteo, de tal manera que abarcaran la mayor parte de la retina media, y todas ellas más o menos a la misma distancia del nervio (**Figura 60**). Los resultados se representaron como la media del número de conos de cada ratón seleccionado (**Figura 61** y **Tabla XV**).

Según estos resultados los ratones con un fenotipo *coneless*/afectado (6132, 6137 y 6224) tenían un menor número de conos que el ratón con fenotipo normal (6237). Por tanto, estos resultados del número de conos estaban en consonancia con los fenotipos obtenidos en los ERGs.

Resultados

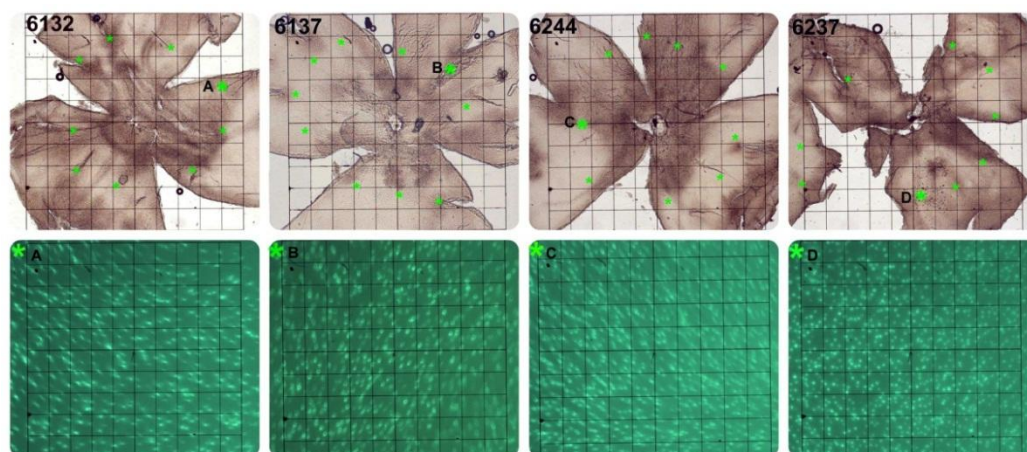


Figura 60. Preparaciones inmunohistoquímicas de retinas enteras con marcaje de conos con lectina. Los asteriscos en verde señalan las zonas de conteo y A, B, C y D la zona de conteo con mayor número de conos (zona temporal). Las imágenes de campo claro de las retinas de los ratones, NMRI 6132 y 6237 e YRT2 6137 y 6244, se hicieron con un objetivo de 2,5x. A, B, C y D-Imágenes de fluorescencia con objetivo de 40x de la zona temporal de la retina.

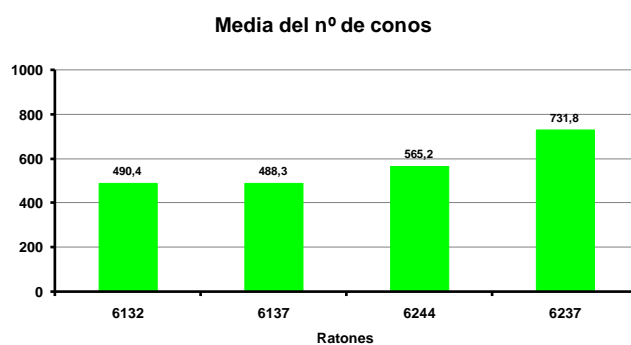


Figura 61. Gráfico de la media del número de conos de las retinas de los ratones 6132, 6137, 6244 y 6237.

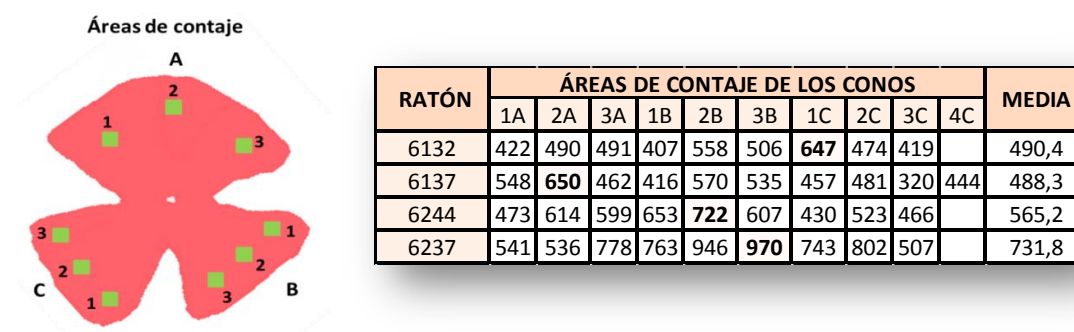


Tabla XV. Número de conos en las distintas áreas de conteo (A, B y C) de las retinas de los ratones 6132, 6137, 6244 y 6237.

Resultados

Complementariamente se calculó la media del número de conos en la zona temporal (zona de la retina de los ratones donde hay una mayor densidad de conos (Vugler y col., 2008)); en las retinas experimentales la zona temporal se señaló como A, B, C y D (**Figura 60**). Y finalmente también se determinó la media de la zona temporal y las dos zonas adyacentes (**Figura 62** y **Tabla XVI**). En todos los casos se observó una clara correlación entre el número de conos y los resultados de los ERGs

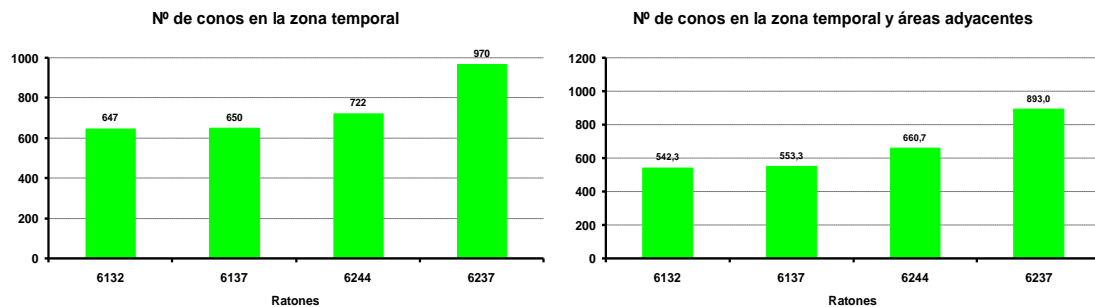


Figura 62. Gráficos de distintos contajes de conos. Gráficos de la media del número de conos en la zona temporal. Y gráfico de la media del número de conos en la zona temporal y sus dos zonas adyacentes.

RATÓN	ÁREAS DE CONTAJE			MEDIA
	adyacente izq.	temporal	adyacente der.	
6132	506	647	474	542,3
6137	548	650	462	553,3
6244	653	722	607	660,7
6237	946	970	763	893

Tabla XVI. Media del número de conos de la zona temporal de la retina. Media del número de conos en el área adyacente izquierda (zona de la retina a la izquierda de la zona temporal), en el área temporal de la retina y en el área adyacente derecha (zona retina a la derecha de la zona temporal). Media del número de conos de las tres áreas.

Junto con los electroretinogramas y antes de los análisis histológicos, también se hicieron tests optomotores a los ratones seleccionados (**Figura 63**), observándose que el ratón 6237, con fenotipo electroretinográfico normal y con el mayor número de conos según la cuantificación histológica, presentaba una respuesta normal al test mientras que el resto de ratones, con fenotipo *coneless* y con menor número de conos tenían unas respuestas peores; pudiéndose correlacionar los datos fenotípicos, obtenidos mediante técnicas no invasivas, con los análisis inmunohistoquímicos (de la Villa y col., 2007).

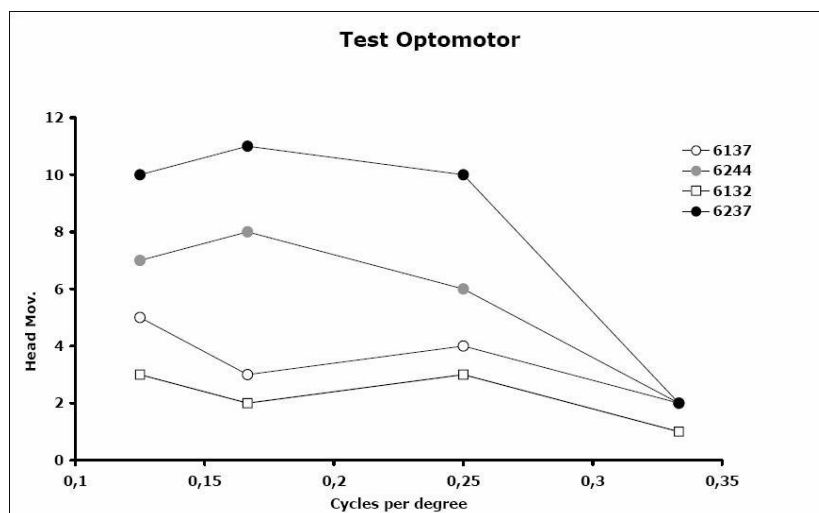


Figura 63. Análisis de la función visual. Gráfico que muestra el número de movimientos de cabeza de cada uno de los ratones con respecto al número de giros del cilindro.

2.4. Análisis de la ultraestructura de la retina de ratones NMRI, TyrTH e YRT2

Paralelamente a los contajes de conos, se llevó a cabo el análisis de la ultraestructura de la retina, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), de los tres modelos animales utilizando el servicio de microscopía electrónica del CNB. En este caso se usaron para el estudio 2 ratones transgénicos YRT2 (pigmentados, sin alteraciones visuales), 2 ratones transgénicos TyrTH (albinos, pero con la función visual corregida debido a la expresión ectópica de L-DOPA en la retina) y 2 NMRI (albino con la función visual alterada). Las edades de los ratones eran aproximadamente de un mes, por tanto, animales jóvenes.

El objetivo de este primer experimento fue la búsqueda de diferencias ultraestructurales de la retina entre el modelo NMRI y los modelos TyrTH e YRT2 (a parte de la obvia, que es la ausencia de melanosomas cargados de melanina en los ratones NMRI y TyrTH).

Se comenzó tomando imágenes de todas las capas de la retina de un ratón YRT2, que en aquel momento se consideraba control (fenotipo pigmentado silvestre), para tener una visión general de las diferentes capas y poder familiarizarse con las distintas estructuras de la retina al MET. En la **Figura 64** se muestra la ultraestructura de las distintas capas de la retina, además de parte de la capa corioidea, que contacta a través de la membrana de Bruch con el EPR. En el citoplasma del EPR se observa gran cantidad de mitocondrias, dispuestas sobre todo en el polo basal de la célula, de forma ovoide y con las crestas mitocondriales muy plegadas. Otros organelos característicos son los melanosomas, con forma alargada y cargados de melanina, que están dispuestos (la mayoría de ellos) en el polo apical de la célula. En los SEF se identifican los discos membranosos apilados y entre el SEF y SIF el cilio que conecta ambas regiones. En la CPE y CPI se encuentran regiones electrodensas, que se corresponden con sinapsis y

Resultados

conexiones “íntimas” célula a célula. En la CNI y CG se ven células con grandes núcleos que ocupan la mayor parte del citoplasma.

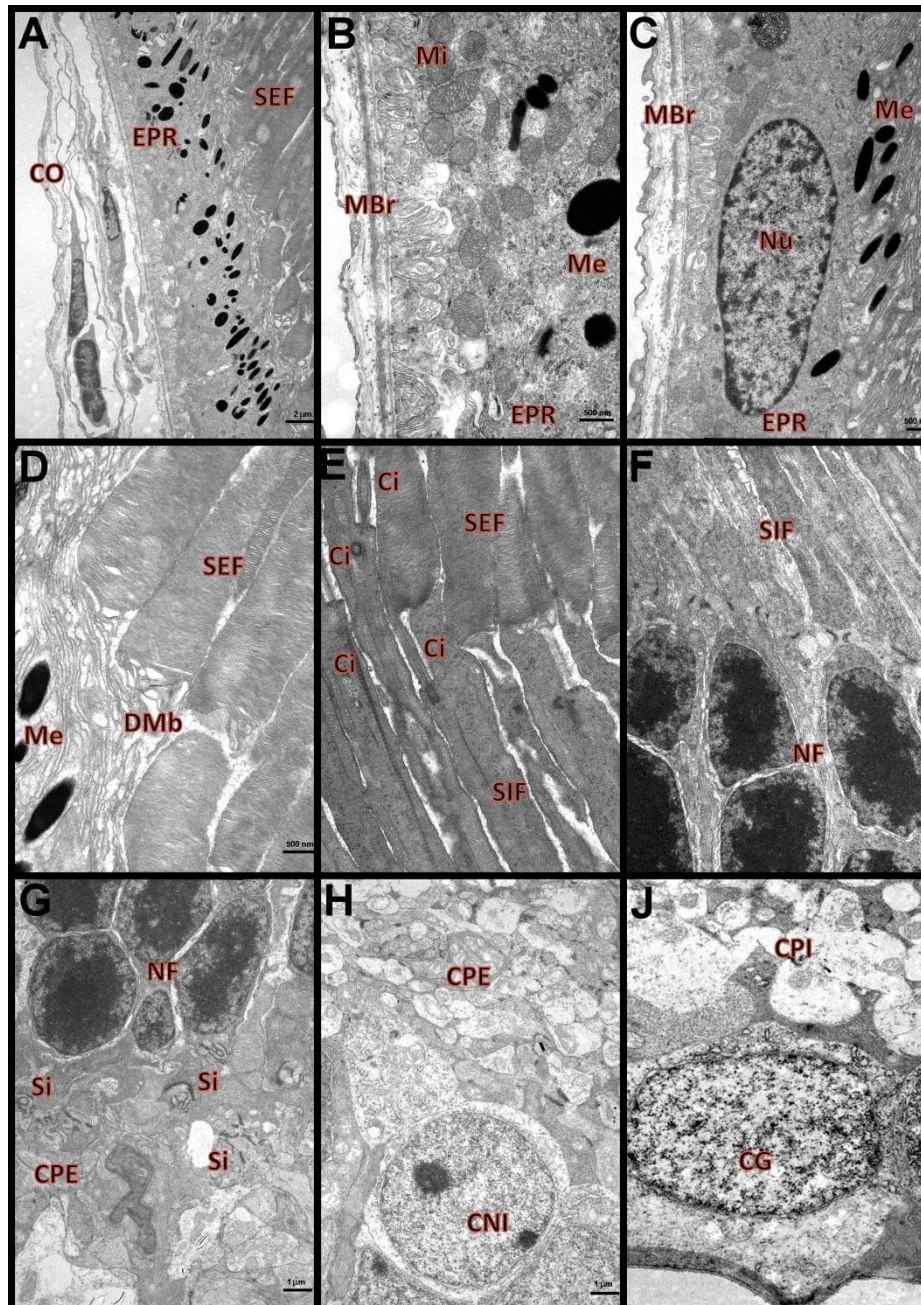


Figura 64. Microfotografías de una retina de un ratón pigmentado YRT2. **A-** Coroides (CO), epitelio pigmentado de la retina (EPR) y segmentos externos de los fotorreceptores (SEF). **B-** Región basal EPR, membrana de Bruch (MBr), mitocondria (Mi), melanosoma (Me). **C-** Núcleo (Nu) de una célula EPR. **D-** Segmentos externos de los fotorreceptores (SEF), discos membranosos (DMb). **E-** Segmentos internos de los fotorreceptores (SIF), cilios conectores en distintas orientaciones (Ci). **F-** Núcleos de los fotorreceptores (NF). **G-** Capa plexiforme externa (CPE) con sinapsis (Si). **H-** Capa nuclear interna (CNI). **I-** Capa plexiforme interna (CPI) y células ganglionares (CG). Barras de escala: 2 μ m (A), 1 μ m (F, G, H e I) y 500 nm (B, C, D y E).

A continuación se hizo un estudio comparativo entre los cortes de las retinas de los 2 ratones NMRI y de los 2 ratones TyrTH con respecto a las retinas de los 2 ratones YRT2 (control), centrándose en tres regiones: el epitelio pigmentado de la retina, los segmentos externos de los fotorreceptores y la capa plexiforme externa. Las imágenes se tomaron a distintos aumentos: 10.000X, 30.000X y 70.000X.

En las microfotografías tomadas del EPR de los 6 ratones, se distinguen claramente dos grupos (independientemente de la presencia o ausencia del transgén YRT2 o TyrTH), los que tienen un EPR normal (**Figura 65-B, D y E**), y los que tienen EPR alterado (**Figura 65-A, C y F**).

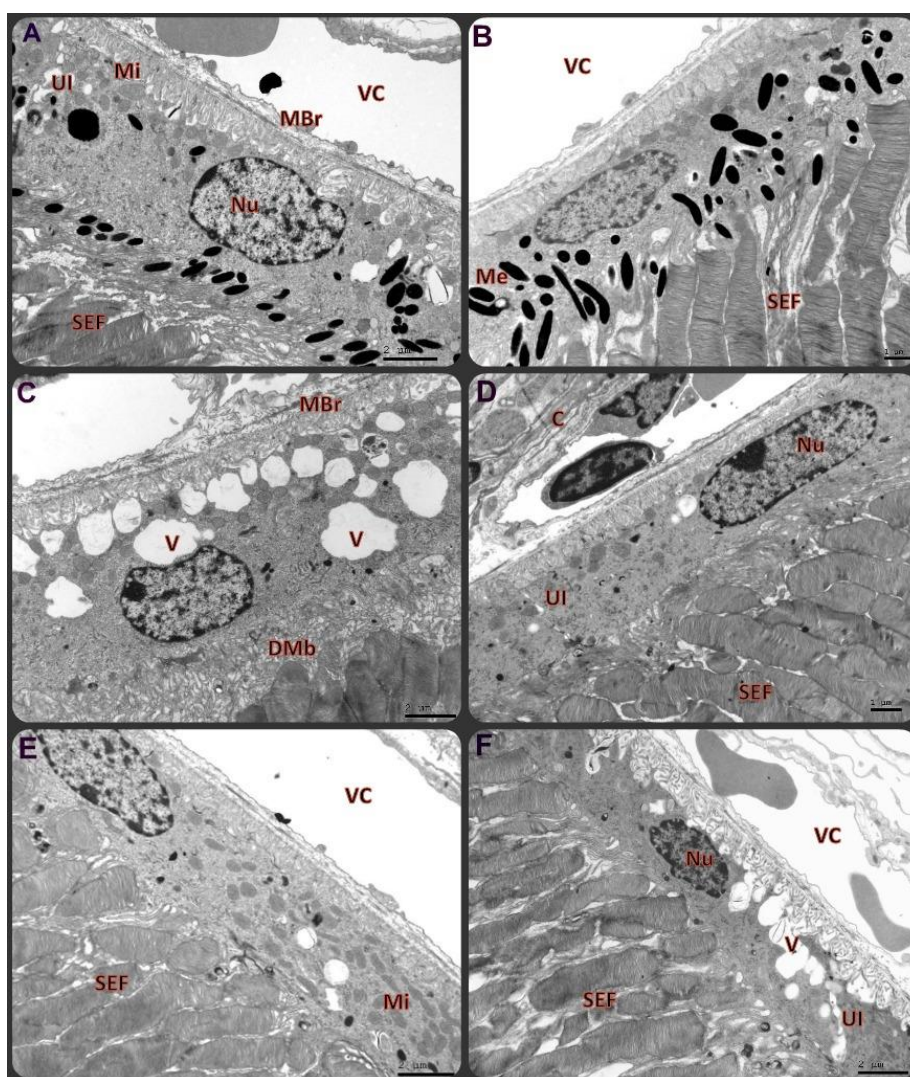


Figura 65. Microfotografías EPR de los ratones YRT2 9761 (A) y 9762 (B), de los ratones TyrTH 9776 (C) y 9813 (D), y de los ratones NMRI 9850 (E) y 9851 (F). El EPR se encuentra alterado en A, C y F y se encuentra normal en B, D y E. Vaso sanguíneo coroides (VC), membrana de Bruch (MBr), uniones íntimas célula a célula (UI), mitocondria (Mi), melanosoma (Me), núcleo (Nu), vacuolas (V), discos membranosos (DMb), segmento externos fotorreceptores (SEF). Barras de escala: 2 μ m (A, C, E y F) y 1 μ m (B y D).

Resultados

En el EPR normal se aprecian los núcleos, las mitocondrias y los melanosomas (cargados de melanina en el caso de los ratones YRT2) con su forma característica. Sin embargo, en el alterado se observa el engrosamiento de la membrana de Bruch con depósitos electrodensos y núcleos picnóticos. Además de la aparición de múltiples vacuolas citoplasmáticas de aspecto vacío o lipídico y de separación de las uniones íntimas célula a célula. Los resultados de las observaciones de todas las retinas se resumen en la **Tabla XVII**.

Ratón	Genotipo	Edad	Obs. ultraestructura
9761	YRT2	1,5meses	Algo alterada
9762	YRT2	1,5meses	Normal
9776	TyrTH	1mes	Alterada
9813	TyrTH	1,5meses	Normal
9850	NMRI	1,5meses	Normal
9851	NMRI	1,5meses	Alterada

Tabla XVII. Resultados de las observaciones de las microfotografías de los ratones analizados.

Las alteraciones observadas aparecen en todos los modelos de ratón estudiados, independientemente de la presencia o ausencia de uno u otro transgén, por lo que de nuevo se tuvo que concluir con que las alteraciones de la ultraestructura estaban segregando en la colonia de ratones albinos HsdWin:NMRI, con independencia de los transgenes.

3. CARACTERIZACIÓN DE UN LOCUS ASOCIADO A UNA RETINOPATÍA EN LOS RATONES HsdWin:NMRI

Todos los resultados que se obtuvieron mediante electrofisiología (electrorretinograma y test optomotor), inmunohistoquímica y microscopía electrónica apuntaban a la existencia de uno o varios loci, que estaban segregando en la colonia de ratones albinos HsdWin:NMRI, que producía un fenotipo visual de déficit de conos además de alteraciones en la ultraestructura de la retina.

Este locus/loci interferiría directamente en los resultados de todos los experimentos anteriormente descritos por nuestro laboratorio, ya que todos los ratones transgénicos utilizados estaban en fondo genético HsdWin:NMRI, y por todos los grupos que anteriormente hubieran utilizado ratones NMRI en estudios del sistema visual. Esto explicaría la alta variabilidad de los resultados, como por ejemplo en los *microarrays* y en las PCR cuantitativas, que provocaban diferencias estadísticamente no significativas.

Partiendo de esta nueva hipótesis, actualizada con los nuevos datos obtenidos, los objetivos de la tesis se convirtieron en intentar identificar el locus o loci causal de fenotipo *coneless*. Para ello lo primero fue necesario conseguir distinguir fenotípicamente los ratones HsdWin:NMRI con un electroretinograma de respuesta a conos normal de los que tenían una respuesta a conos disminuida o incluso nula (*coneless*), en colaboración con el Prof. Pedro de la Villa (Universidad de Alcalá de Henares). Una vez fenotipados se diseñaron y establecieron los cruces necesarios para posteriormente poder hacer un análisis de ligamiento genético con polimorfismos de SNPs y de este modo intentar mapear la mutación en el genoma del ratón.

3.1. Análisis electroretinográfico

Se hizo un análisis electroretinográfico estándar a 55 ratones HsdWin:NMRI (Harlan) para poder caracterizarlos en dos grupos, según su fenotipo visual fuera normal o *coneless*. Los resultados electroretinográficos son similares a los del apartado 2.3.

3.2. Diseño y análisis de las familias

Se establecieron tres tipos de cruces con los ratones fenotipados: uno entre ratones con fenotipo *coneless*, otro entre ratones con fenotipo normal y un último entre un ratón con un fenotipo normal y otro *coneless*. De todos los cruces puestos, se consiguieron establecer 9 pedigríes parcialmente independientes (**Figura 66**): cuatro pedigríes (P1, P2, P4 y P6) constituidos por tres generaciones (F0, F1 y F2) y cinco pedigríes (P3, P5, P7, P8 y P9) con dos generaciones (F0 y F1).

Un total de 151 individuos fueron fenotipados; se obtuvo ADN de todos ellos a partir de una pequeña biopsia de cola. También se recogieron ojos de algunos de ellos para posteriores ensayos estructurales.

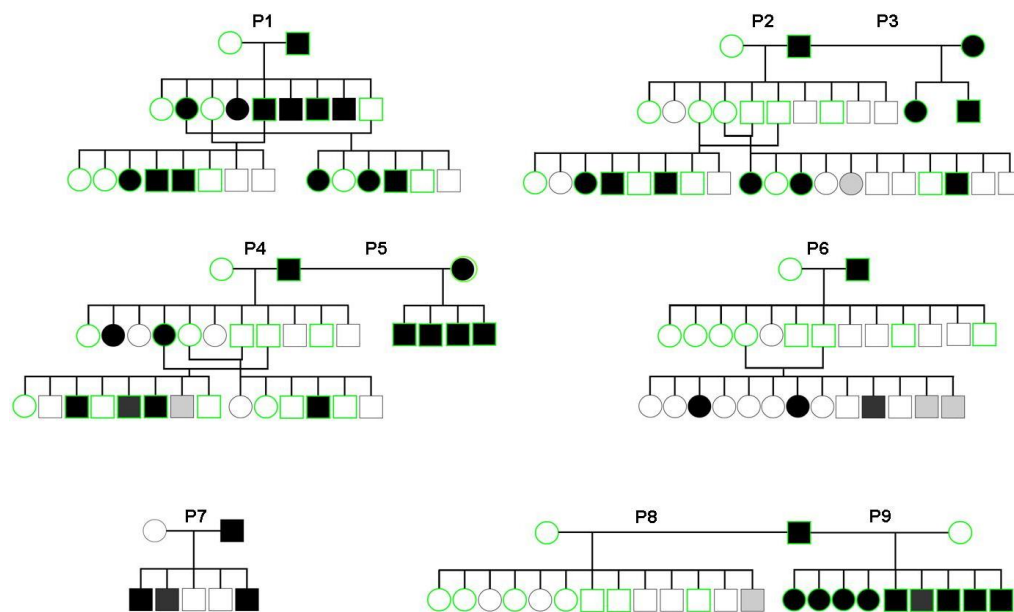


Figura 66. Pedigrís obtenidos. Las hembras se representan con círculos y los machos con cuadrados. Fenotipo normal (relleno en blanco), fenotipo *coneless* (relleno negro) y sin fenotipar (relleno en gris). Los ratones rodeados perfilados en verde son los que fueron seleccionados para el análisis de ligamiento genético en el panel de Illumina (CEGEN).

De la observación de los pedigrís obtenidos (**Figura 66**), se concluyó que el fenotipo *coneless* se debía a la mutación en un solo locus (monosómica), que no estaba ligado al sexo (autosomal) y seguía una herencia recesiva. El tipo de herencia se comprobó con la χ^2 (Montoliu, 2012).

3.3. Estudio estructural de las retinas

3.3.1. Histológico

De algunos de los ratones fenotipados normales y *coneless* se realizó un estudio histológico comparativo del epitelio pigmentado de la retina y de los fotorreceptores. Se hicieron tinciones con Cresil Violeta y se tomaron imágenes de microscopía de campo claro.

Las retinas de los ratones con fenotipo visual *coneless* presentan alteraciones del EPR con respecto a las retinas de los ratones con fenotipo normal. Las retinas *coneless* presentan grandes vacuolas, que ocupan gran parte del citoplasma de las células del EPR, y una aparente desorganización de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (**Figura 67**).

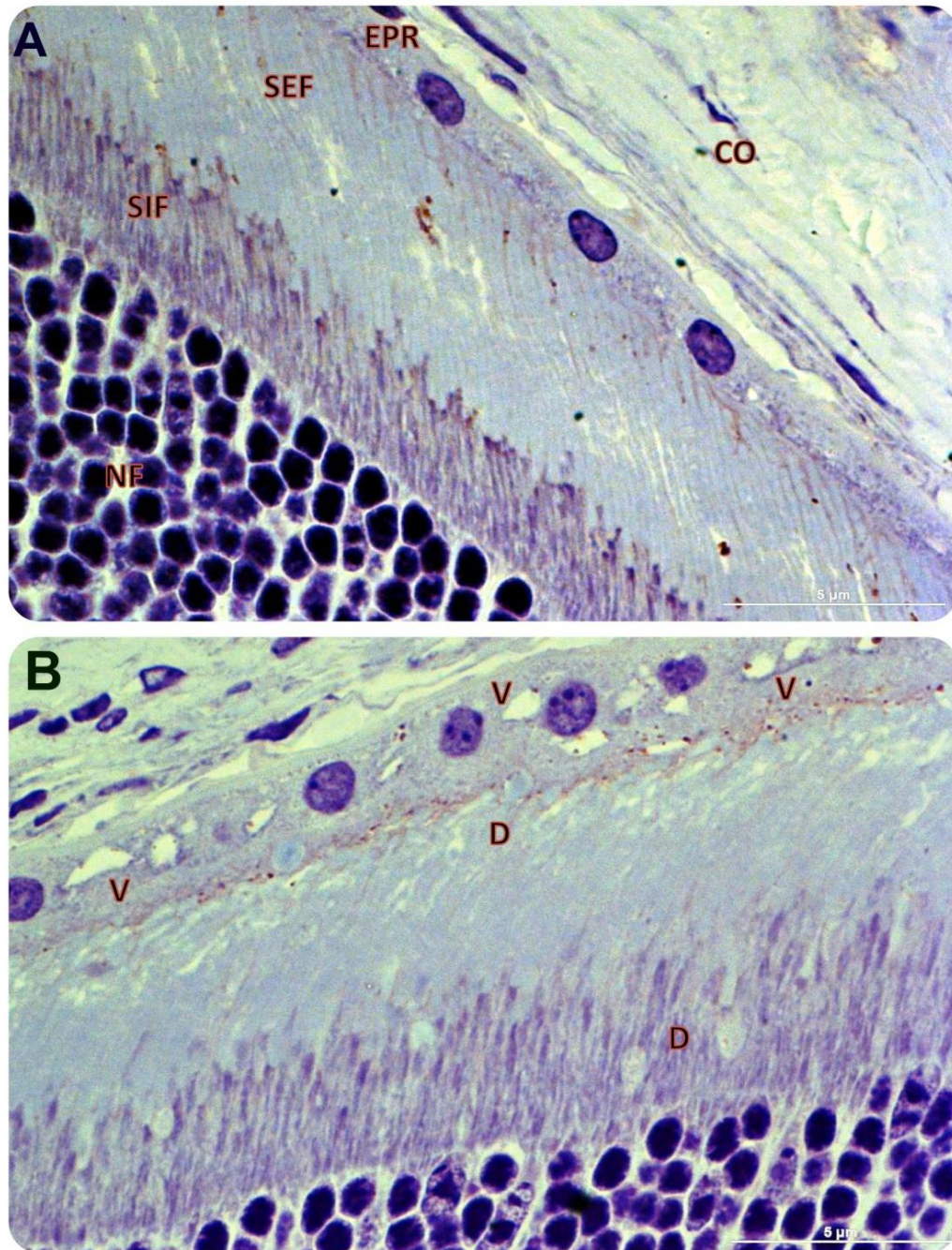


Figura 67. Cortes horizontales de retina. **A-** Imagen de una retina de un ratón con fenotipo visual normal. **B-** Imagen de una retina con fenotipo visual *coneless*. Coroides (CO), epitelio pigmentado de la retina (EPR), los segmentos externos (SE) e inter nos (SI) y los núcleos de los fotorreceptores (NF), vacuolas (V) desorganización SE y SI fotorreceptores (D). Barra de escala: 5 µm.

3.3.2. Inmunohistológico: tipos de conos

Los ojos de los ratones tienen dos tipos de conos, a diferencia de los humanos que tienen tres, según a la longitud de onda a la que absorba la luz la opsina que contenga. De este modo, distinguimos entre conos azules (los que absorben a menor longitud de onda, 430 nm) y conos verdes (los que absorben a mayor longitud de onda 530-560 nm).

Para analizar si algún tipo de cono se veía más afectado que otro en el fenotipo *coneless* se hicieron ensayos inmunohistoquímicos de retinas enteras con anticuerpos específicos para los dos tipos de conos presentes en la retinas de los ratones (conos azules, con anticuerpo frente opsina S y conos verdes, con anticuerpo frente opsina L-M).

Se tomaron imágenes de fluorescencia con un microscopio confocal de toda la retina periférica de los dos fenotipos, con el fin de estudiar el patrón de distribución de los conos en la retina. Los conos verdes (opsina L-M) tienen un gradiente de expresión dorso-ventral, es decir, un mayor número de conos verdes en la zona dorsal de la retina y va decreciendo a medida que nos dirigimos a la zona ventral y los conos azules (opsina S) tienen un gradiente de expresión ventral-dorsal, por tanto con un mayor número de conos verdes en la zona ventral hasta prácticamente desaparecer en la retina dorsal (Haverkamp y col., 2005; Vugler y col., 2008; Swaroop y col., 2010).

En las imágenes de una retina *coneless* se observó un menor número de conos azules (marcados en verde) que en la retina normal (**Figuras 68 y 69**), por tanto parecía ser que los conos azules eran los que más se veían afectados en el fenotipo *coneless*.

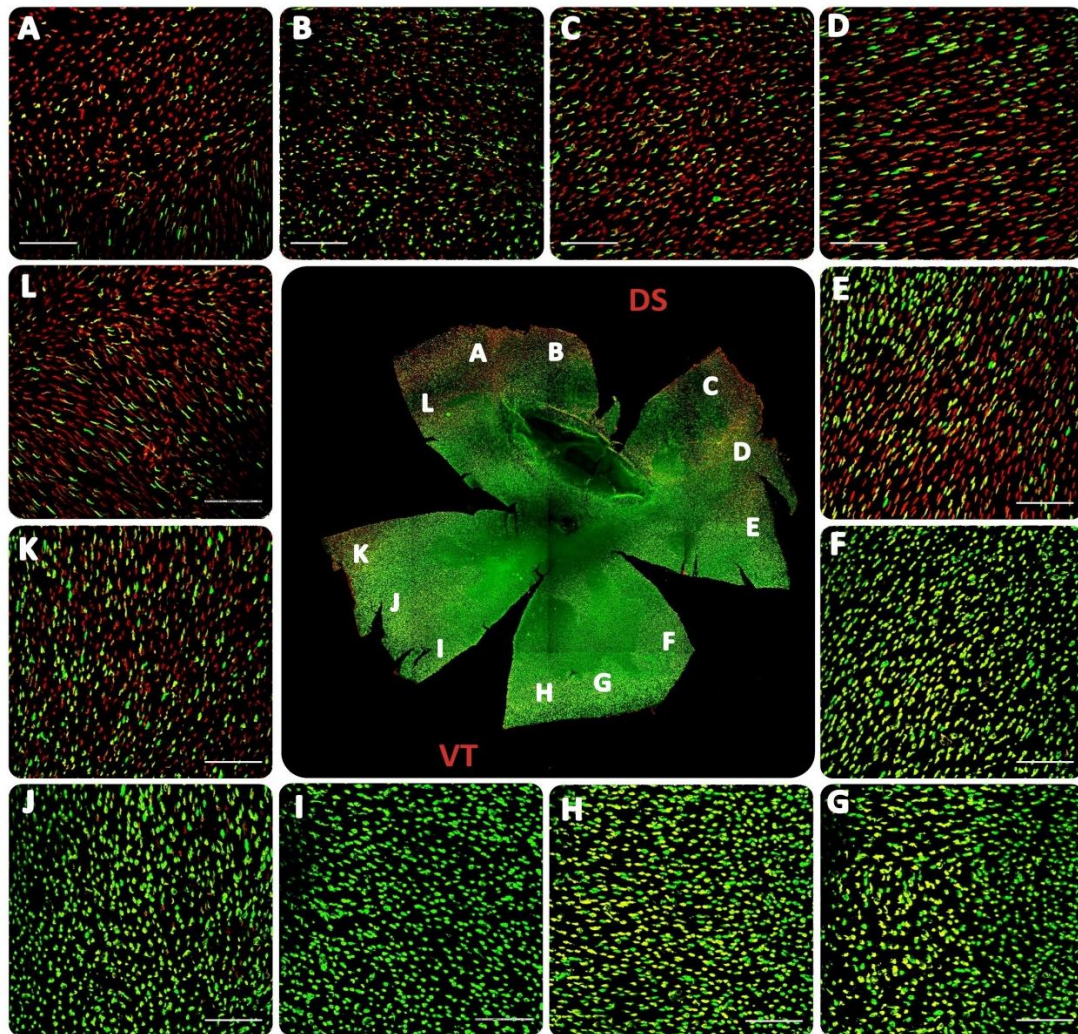


Figura 68. Inmunohistoquímica: tipos de conos en una retina normal. Marcados en rojo los conos L-M y en verde los conos S. Imagen central (composición de varias imágenes tomadas con un objetivo de 10x); eje dorso-ventral (DS-VT). Imágenes de los conos de las distintas zonas marcadas en la imagen central (A-L). Barra de escala: 50 μ m.

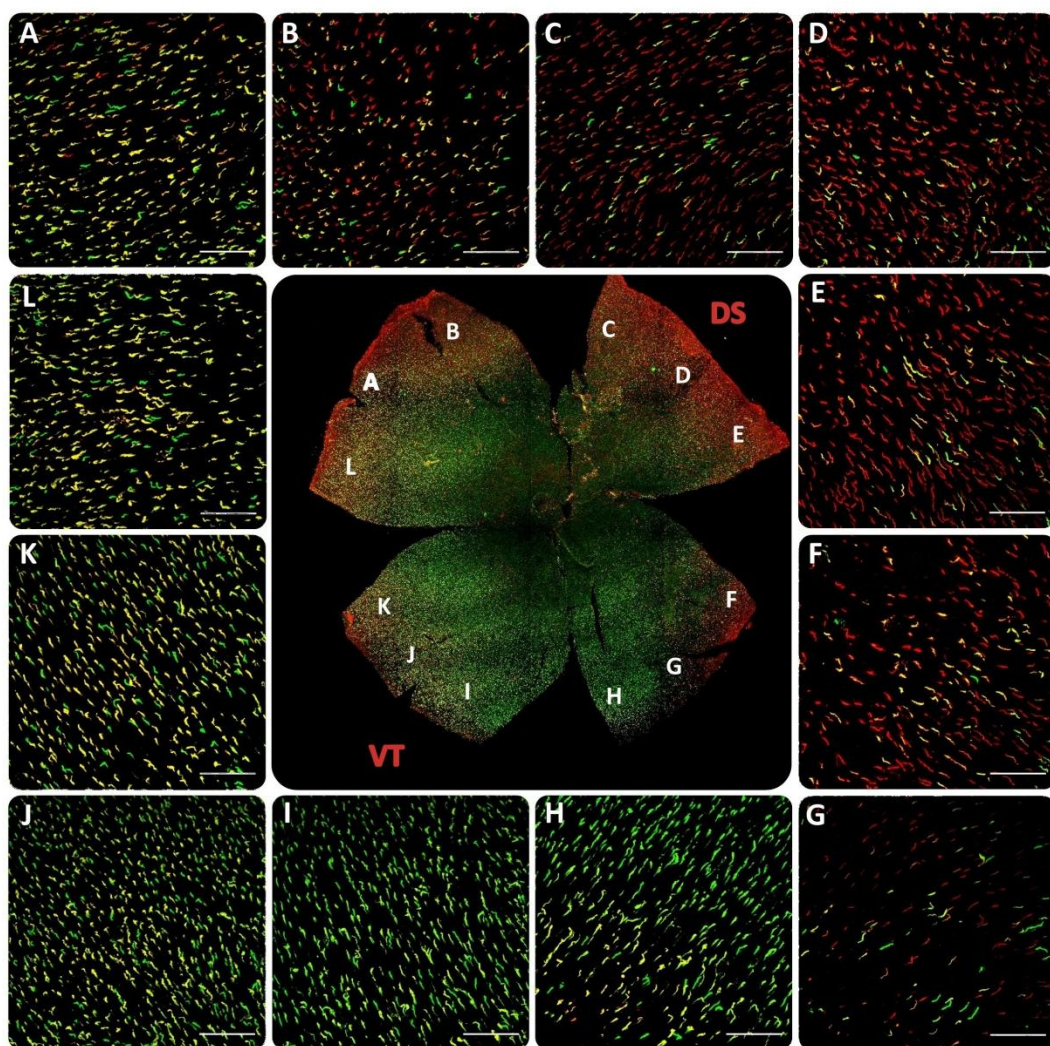


Figura 69. Inmunohistoquímica: tipos de conos en una retina *coneless*. Marcados en verde los conos S y en rojo los conos L-M. Imagen central (composición de varias imágenes tomadas con un objetivo de 10x); eje dorso-ventral (DS-VT). Imágenes de los conos de las distintas zonas marcadas en la imagen central (A-L). Barra de escala: 50 μ m.

3.3.3. Ultraestructura

El primer experimento de ultramicroscopía se hizo con el objetivo de encontrar diferencias entre los tres modelos animales NMRI, YRT2 y TyrTH sin tener en cuenta que, en realidad, el fenotipo *coneless* estaba segregando en la población HsdWin:NMRI como así se comprobó posteriormente. Aun así se intuyó la existencia de ese fenotipo que se correlacionaría con las retinas de ultraestructura alterada. Para confirmar esta nueva hipótesis se hicieron nuevas preparaciones de microscopía electrónica con algunos de los ratones de los pedigríes establecidos y, por tanto, fenotipados por ERGs.

Se hizo el mismo estudio comparativo descrito en el experimento anterior (apartado 2.4.) en un total de 9 ratones de distintas edades (**Tabla XVIII**) y con excepción del ratón C2201, que teniendo un fenotipo normal presentaba una retina con una ultraestructura bastante alterada, en el resto de los animales la correlación fenotipo/ultraestructura era la esperada: mientras que los ratones con fenotipo normal presentaban una ultraestructura de la retina sin signos degenerativos, los ratones de fenotipo *coneless* mostraban estructuras claramente degenerativas (**Figura 70**).

Las células del EPR de los ratones normales presentaban unos núcleos de contornos redondeados con cromatina poco densa, algunos gránulos de lipofucsina localizados fundamentalmente en la porción apical de la célula y mitocondrias con aspecto redondeado con sus crestas mitocondriales muy plegadas. La membrana de Bruch presentaba un aspecto uniforme y continuo. Ocasionalmente aparecían algunas vacuolas autofágicas, pero no se observaron vacuolas de aspecto vacío (**Figura 70-A, C y E; Figura 71-A, C, E y G**).

Sin embargo en las células del EPR de los ratones *coneless* se observaron ciertas alteraciones a nivel nuclear y citoplasmático. La membrana del núcleo presentaba un contorno ondulado con un aumento de la densidad de la cromatina (picnosis). El volumen citoplasmático parecía ser menor que en los ratones normales y también se observó un aumento considerable de los gránulos de lipofucsina (**Figura 70- B, D y F**).

La membrana de Bruch se encontraba muy engrosada con respecto al tamaño que se observó en los ratones normales, además de haber perdido su estructura laminar característica (5 capas fibrilares) (**Figura 71-A** (normal) y **B** (*coneless*)). Las uniones íntimas “célula a célula” entre células contiguas del EPR eran, en muchas ocasiones, casi inexistentes; en la separación que aparecía entre ellas, se apreciaban gran cantidad de desechos fibrilares y detritus (**Figura 71- C** (normal) y **D** (*coneless*)).

Pero sin lugar a dudas, lo más característico de estas retinas alteradas era la presencia de un gran número de vacuolas en las células del EPR. La mayoría de estas vacuolas eran de aspecto vacío y se encontraban rodeadas de membrana; en muchas de ellas se apreciaban desechos fibrilares en su interior (**Figura 70- B, D y F, Figura 71- E** (normal) y **B** (*coneless*)). En algunas ocasiones estas vacuolas llegaban hasta los

Resultados

segmentos externos de los fotorreceptores, rompiendo los apilamientos de los discos membranosos (**Figura 71- H**).

Estas lesiones son típicas de retinas degenerativas, por causas ambientales o genéticas, y agravadas con la edad (Kim y col., 2008). La particularidad de estos ratones con fenotipo *coneless*, es que estas lesiones aparecen a edades muy tempranas (3 meses) (**Tabla XVIII**).

También se observaron diferencias a nivel de la capa plexiforme externa, concretamente en la cantidad de vesículas presinápticas acumuladas en los pedículos de los conos, y en menor medida en las esférulas de los bastones. Los terminales sinápticos de los fotorreceptores de las retinas con fenotipo *coneless* exhiben muy pocas vesículas presinápticas en comparación con los terminales sinápticos de los fotorreceptores de las retinas normales. Esto indicaría una posible interrupción o alteración de la transmisión de la señal eléctrica de los fotorreceptores al resto de neuronas de la neurorretina (**Figura 72 y 73**).

Ratón	Genotipo	Fenotipo	Edad	Obs. ultraestructura
1364	NMRI	coneless (aa)	6meses	Alterada
1365	NMRI	coneless (aa)	6meses	Alterada
1314	NMRI	coneless (aa)	9meses	Alterada
1368	NMRI	normal (A-)	9meses	Normal
1354	NMRI	coneless (aa)	9meses	Alterada
2885	NMRI	normal (A-)	9meses	Normal
L 01 01	NMRI	normal (Aa)	5meses	Normal
C22 01	NMRI	normal (A-)	3meses	Alterada
C22 03	NMRI	coneless (aa)	3meses	Alterada

Tabla XVIII. Resultados de las observaciones de las microfotografías de los ratones analizados.

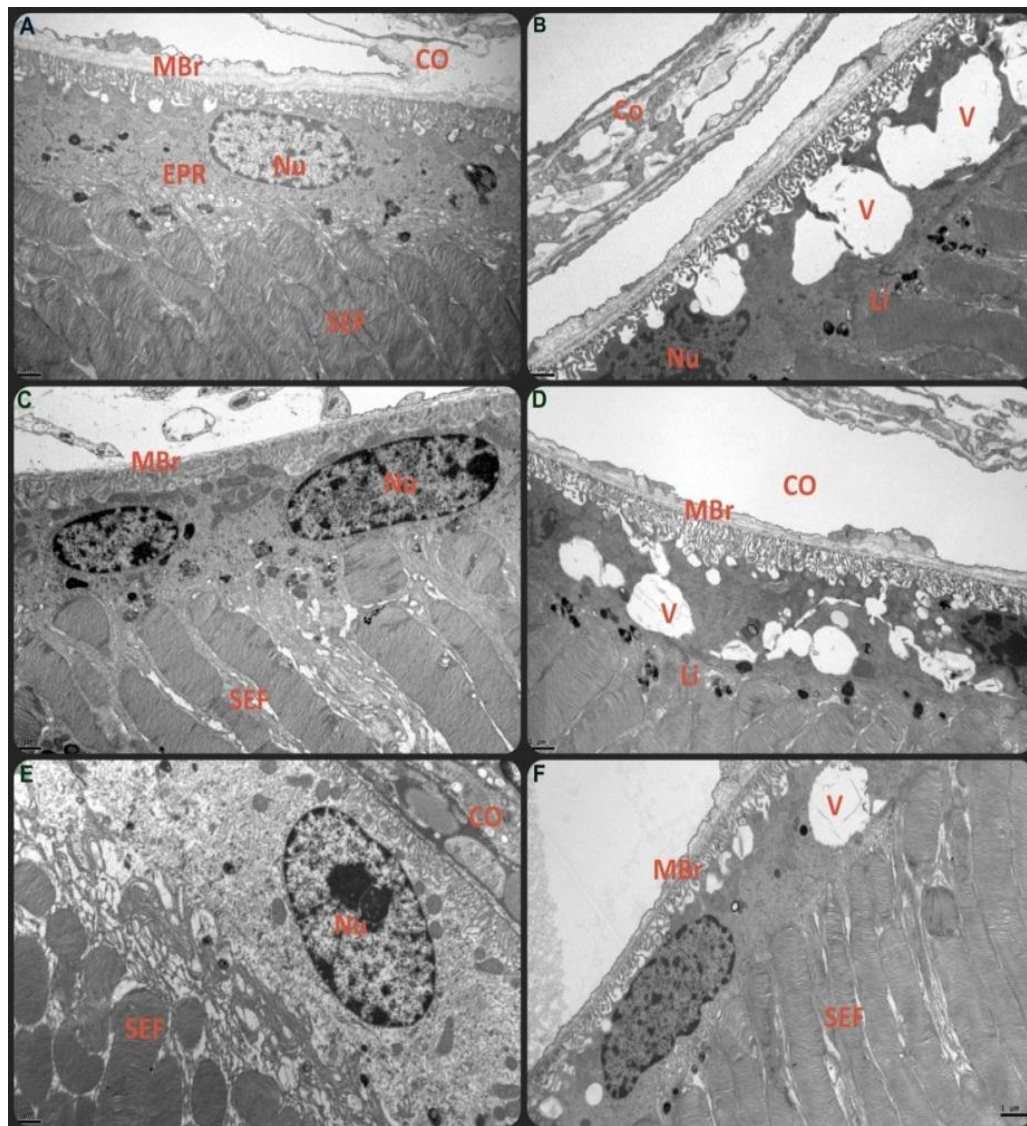


Figura 70. Microfotografías EPR. **A, C y E**- ratones con fenotipo normal (1368, 2885 y L0101). **B, D y F**- ratones con fenotipo *coneless* (1364, 1365 y 1314). Coroides (CO), membrana de Bruch (MBr), núcleo (N), segmentos externos de los fotorreceptores (SEF), vacuolas (V) y gránulos lipofucsina (Li). Barras de escala: 1μm.

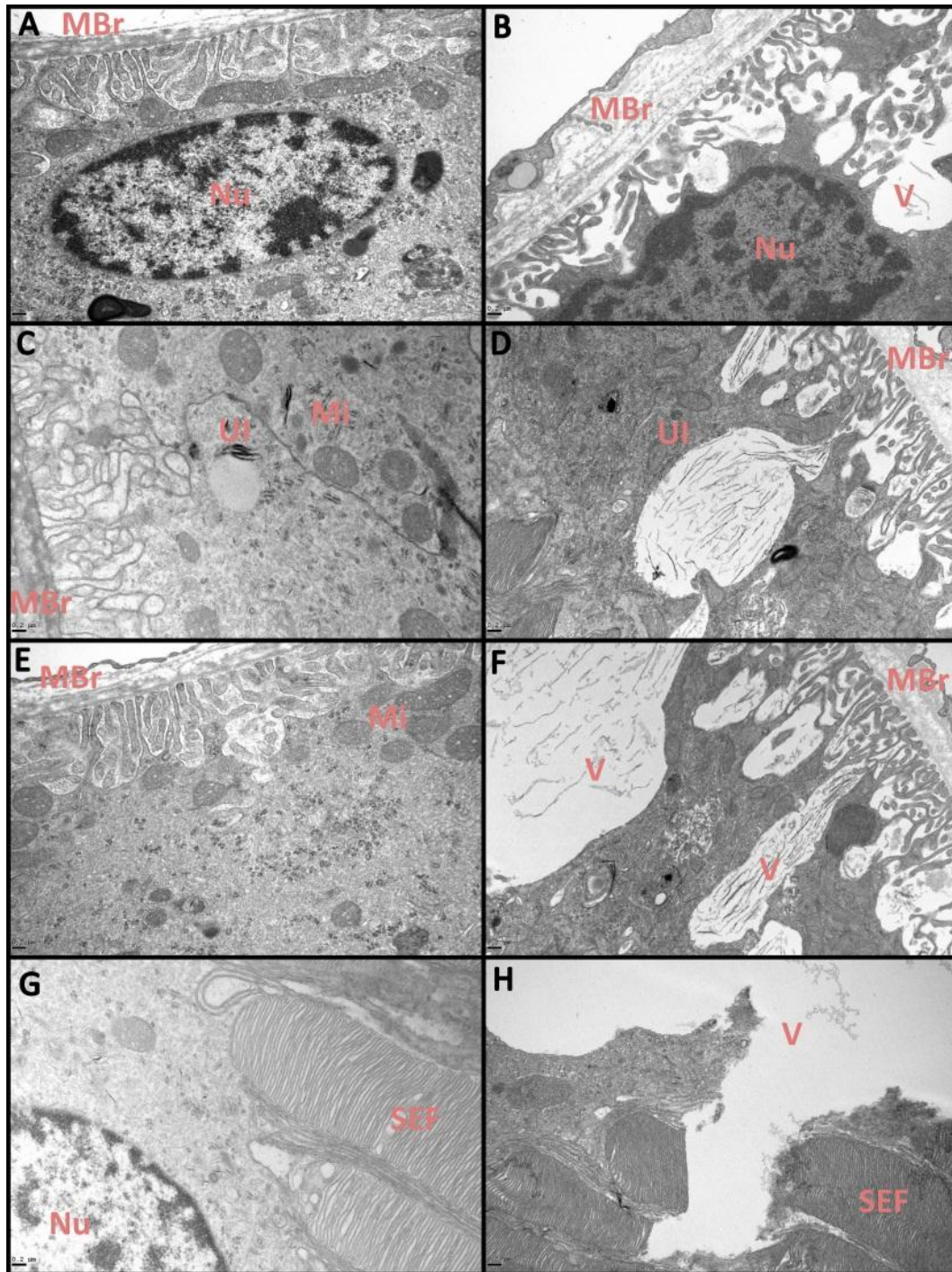


Figura 71. Microfotografías EPR a más aumento. **A, C, E y G** retina normal y **B, D, F y H** retina *coneless*. Membrana de Bruch (MBr), núcleo (N), segmentos externos de los fotorreceptores (SEF), vacuolas (V), mitocondrias (Mi), uniones íntimas célula a célula (UI). Barra de escala: 0,2 μm.

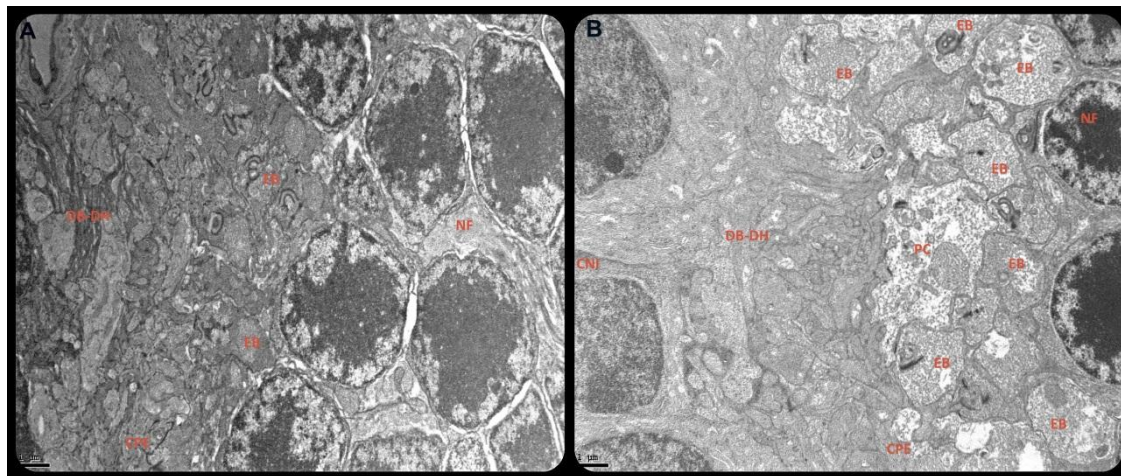


Figura 72. Microfotografías de la capa plexiforme externa (CPE). **A-** retina ratón normal y **B-** retina ratón *coneless*. Núcleos fotorreceptores (NF), capa nuclear interna (CNI), dendritas células bipolares y horizontales (DB-DH), esférula bastón (EB), pedículo de cono (PC). Barra de escala: 1µm.

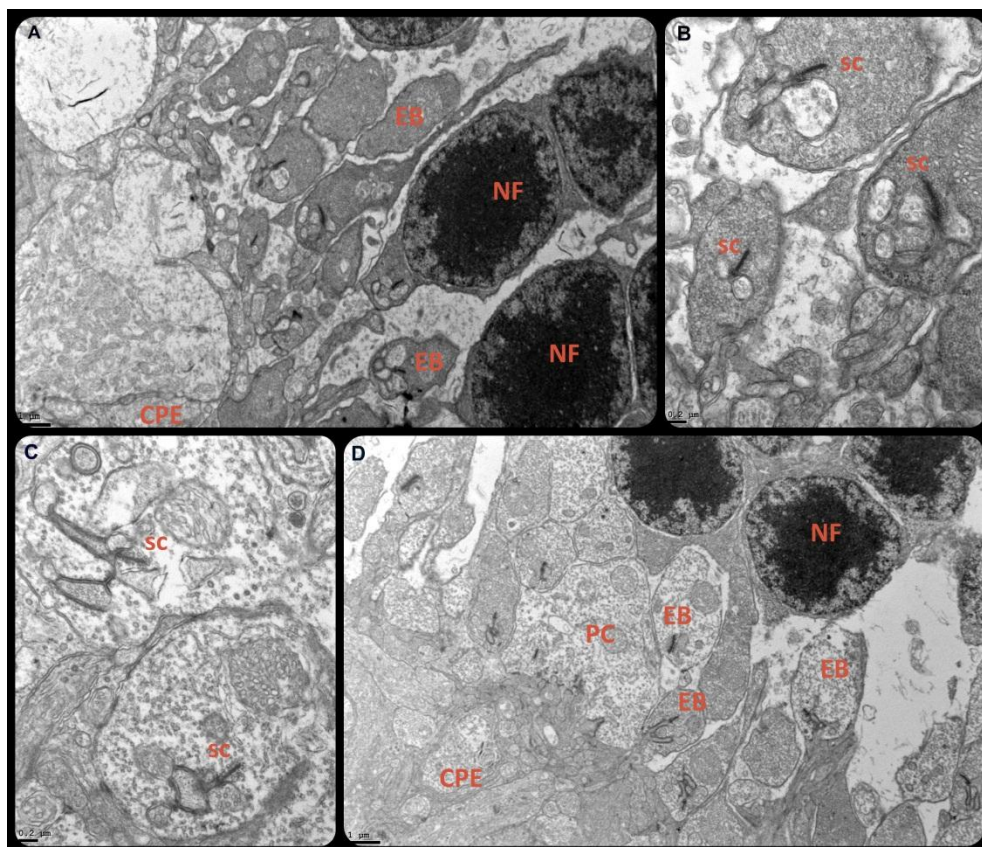


Figura 73. Microfotografías de la capa plexiforme externa (CPE). **A y B-** retina ratón normal y **C y D-** retina ratón *coneless*. Núcleos fotorreceptores (NF), esférula bastón (EB), pedículo de cono (PC) y sinápsis en cintilla (SC). Barra de escala: 1µm(A y D) y 0,2 µm (B y C).

3.3.4. Inmunohistológico: sinapsis en la capa plexiforme externa

Teniendo en cuenta las diferencias ultraestructurales encontradas en la CPE por microscopía electrónica de transmisión (ver apartado 3.3.3.), entre las retinas de los ratones con fenotipo visual normal y con fenotipo *coneless*; donde parece que hay una alteración o disminución de la transmisión de la señal, se diseñó un nuevo ensayo inmunohistoquímico más específico para estudiar las sinapsis a nivel de la capa plexiforme externa de la retina.

Se estudiaron dos tipos de sinapsis: las sinapsis entre las dendritas de las células bipolares y los terminales sinápticos de los fotorreceptores y entre las dendritas de las células horizontales y los terminales sinápticos de los fotorreceptores. Para ello se siguió las pautas descritas en Cuenca y col., 2010.

Para estudiar las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares se usó un anticuerpo contra PKC- α , que marca las dendritas de las células bipolares y un anticuerpo frente a Bassoon, que marca las sinapsis en cintilla de los fotorreceptores. Y para estudiar las sinapsis entre los fotorreceptores y las células horizontales se usaron los anticuerpos contra Calbindina, que marca las dendritas de las células horizontales, y contra Sinaptofisina, que marca el axón terminal de los fotorreceptores.

Se utilizaron para los ensayos, además de los cortes horizontales de retina de un ratón con fenotipo normal y otro *coneless*, cortes de retina de un ratón silvestre de la cepa C57BL/6 como muestra control.

Las conexiones entre las células bipolares y fotorreceptores aparecían disminuidas en las retinas de los ratones normales y *coneless*, con respecto a las conexiones de la retina del ratón control. El número de células bipolares en las retinas albinas, era menor con respecto al control de acuerdo a su condición albina (Jeffery, 1997), pero similar entre ellas.

Tanto las imágenes que mostraban las conexiones entre las dendritas de las células bipolares y los axones de los fotorreceptores (**Figura 74**) como las imágenes de las conexiones entre las células horizontales y los fotorreceptores (**Figura 75**), revelaron un menor número de conexiones sinápticas en la retina del ratón con fenotipo normal (imágenes **B**, **E**, **H** y **K** de las **Figuras 74** y **75**) que en la retina del ratón con fenotipo *coneless* (imágenes **C**, **F**, **I** y **L**; **Figuras 74** y **75**). El mayor número de conexiones sinápticas en la retina *coneless* con respecto a la normal podría deberse a algún tipo de mecanismo compensatorio para intentar subsanar la falta de funcionalidad de los conos.

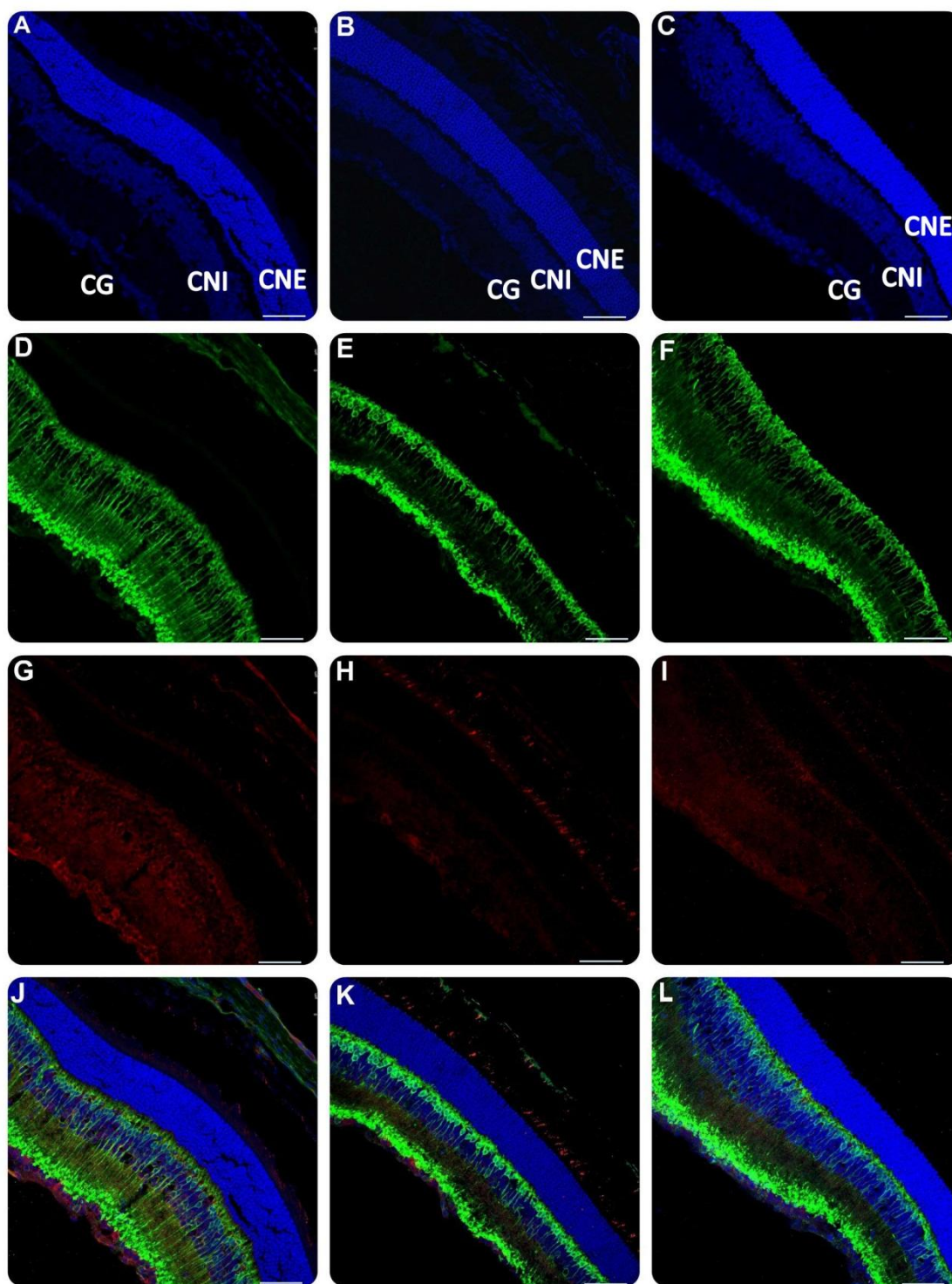


Figura 74. Inmunohistoquímica de las conexiones sinápticas entre células bipolares y fotorreceptores (verde-PKC- α , rojo-Bassoon y núcleos en azul). Proyecciones en azul (**A**, **B** y **C**), proyecciones en verde (**D**, **E** y **F**), proyecciones en rojo (**G**, **H** y **I**) y las superposiciones (**J**, **K** y **L**). Retina ratón C57BL/6 control (**A**, **D**, **G** y **J**), retina normal (**B**, **E**, **H** y **K**) y retina *coneless* (**C**, **F**, **I** y **L**). Barras de escala: 50 μ m.

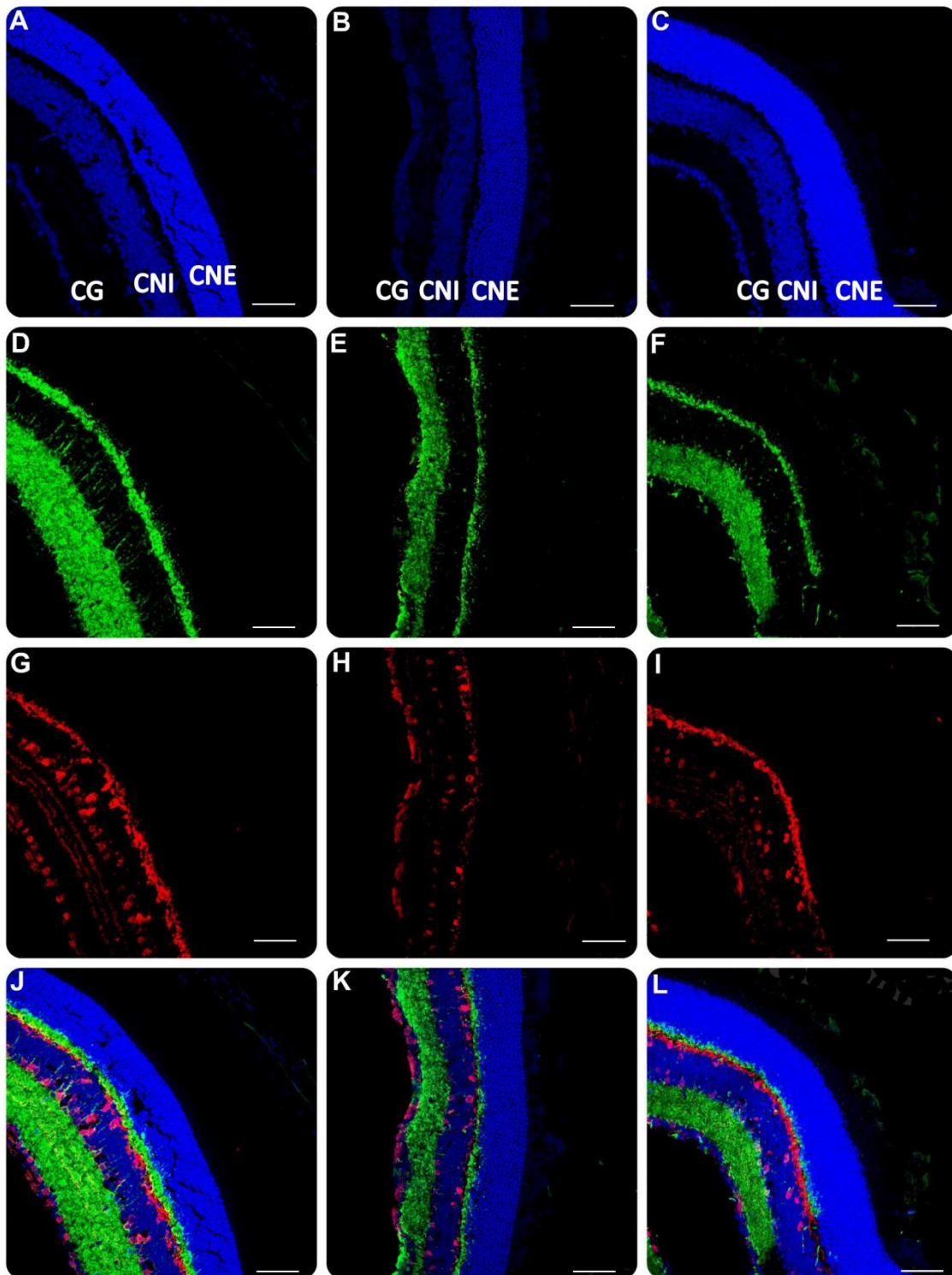


Figura 75. Inmunohistoquímica de las conexiones sinápticas entre células horizontales y fotorreceptores (verde-Sinaptofisina, rojo-Calbindina y núcleos en azul). Proyecciones en azul (A, B y C), proyecciones en verde (D, E y F), proyecciones en rojo (G, H y I) y las superposiciones (J, K y L). Retina ratón C57BL/6 control (A, D, G y J), retina normal (B, E, H y K) y retina *coneless* (C, F, I y L). Barras de escala: 50 μ m.

3.4. Estudio de los polimorfismos asociados al fenotipo *coneless*

Del estudio de los nueve pedigrís establecidos (**Figura 65**) y del fenotipo visual de cada uno de sus miembros se dedujo que el fenotipo *coneless* era debido a una mutación monosómica, autosómica y recesiva. Esta mutación, asociada al fenotipo *coneless*, inducía el desarrollo de diversas lesiones patológicas en el EPR (estudios estructurales, apartado 3.3.3.), típicas de diversas retinopatías, como por ejemplo la DMAE (Kim y col., 2008).

3.4.1. Método del mejor gen candidato: *Pten*

Teniendo en cuenta las características típicas de la DMAE (engrosamiento de la membrana de Bruch, presencia de pequeños depósitos hialinos (*Drusens*), etc) observadas en las microfotografías del epitelio pigmentado de la retina de los ratones con fenotipo *coneless* y de la bibliografía encontrada al respecto se decidió seleccionar con primer gen candidato a *Pten* (Jomary y col., 2006; Kim y col., 2008).

El gen *Pten* codifica para una fosfatasa esencial para el mantenimiento de la integridad de las uniones célula a célula del epitelio pigmentado de la retina. Su inactivación provoca un fenotipo típico de DMAE, con la presencia de *drusens*, grandes vacuolas, gránulos de lipofucsina, y vesículas de pigmento dismórficas (Jomary y col., 2006; Kim y col., 2008).

Con objeto de comprobar la posible implicación de *Pten* en el fenotipo *coneless*, se hizo un ensayo inmunohistoquímico en cortes horizontales de una retina normal y de una *coneless*, observándose un mayor marcaje contra *Pten* en la capa de células ganglionares de la retina normal y en el EPR de la retina *coneless*. Esta observación parecía sugerir que *Pten* fuera probablemente el gen implicado (**Figura 76**).

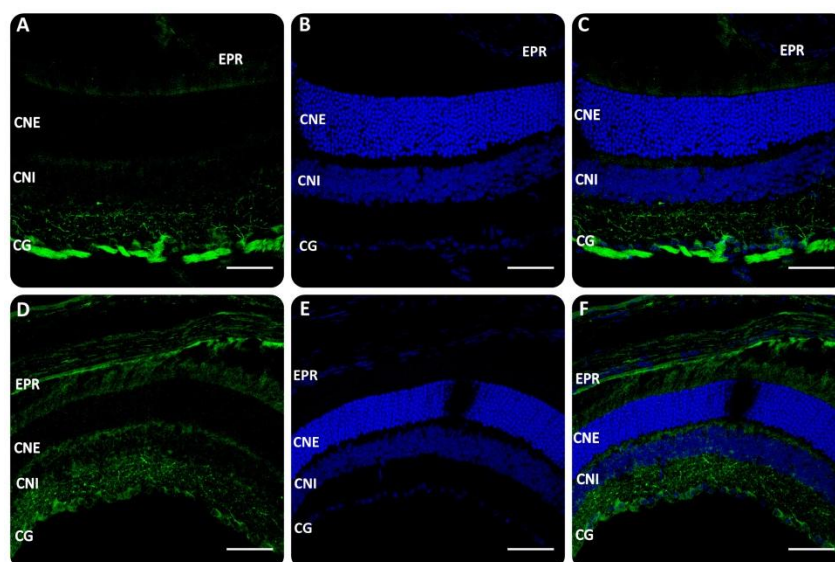


Figura 76. Inmunohistoquímica de *Pten*. Retina normal (A, B y C) y Retina *coneless* (D, E y F). Proyecciones para el verde (A y D) y para el azul (B y E) y superposiciones (C y F). El marcaje verde se corresponde con *Pten* y el azul con los núcleos. Epitelio pigmentado de la retina (EPR), capa nuclear externa (CNE), capa nuclear interna (CNI) y capa de células ganglionares (CG). Barras de escala: 50 μ m.

3.4.1.1. Análisis de la secuencia de ADN que codifica para el gen *Pten*

Tras los resultados anteriores y con objeto de verificar si el gen *Pten* podría ser el candidato implicado en la mutación, se procedió al análisis de la secuencia de ADN que codifica. El gen *Pten* se localiza en el cromosoma 19 de ratón (19:32831987-32900650), con 9 exones y un transcrito de 8.292 pbs. Se secuenciaron por el método de Sanger todas las secuencias codificantes (cadena positiva y negativa) para un ratón homocigoto silvestre (AA) y para un homocigoto mutante (aa) y se compararon las secuencias con la secuencia de referencia del genoma de ratón que aparece en Ensembl. Para ello se diseñaron un par de cebadores para cada exón. Para las regiones UTR, al ser demasiado grandes para secuenciar de una vez, se tuvieron que diseñar varios pares de cebadores, como se indica en la **Figura 77** y en la **Tabla XIX** se muestran los cebadores con la temperatura de anillamiento (T_m) óptima.

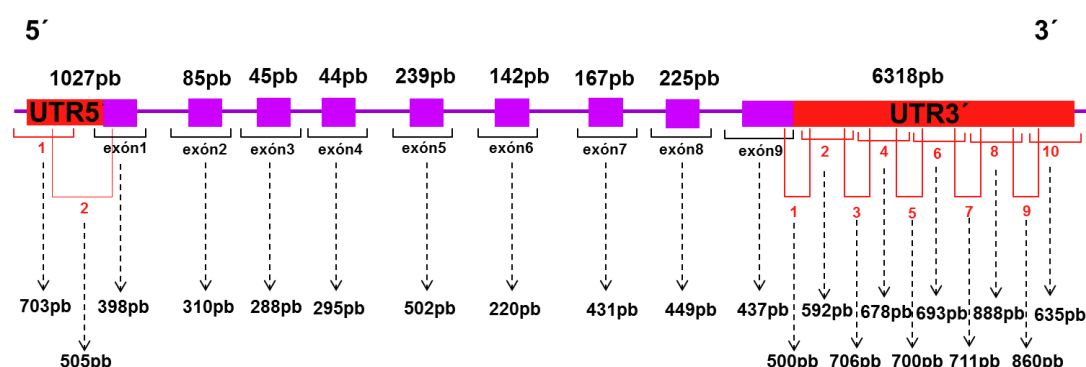


Figura 77. Representación esquemática de los exones y regiones UTR de *Pten*. Tamaños en pbs correspondientes a los exones y regiones UTR. Las flechas discontinuas señalan los tamaños en pbs de los fragmentos que se amplificaron por PCR.

Exón	Longitud (pb)	Cebador Forward 5'→3'	T_m	Cebador reverse 5'→3'	T_m	Producto PCR (pb)
UTR5'	948	GTACCTTTGCCGGGTCTCTC	61,02	CAATGGTGACAGGCGACTC	60,26	703
		GGAGAGAGACGGTGGAAGAA	59,38	GATGGAAATGGCTCTGGACT	59,09	505
1	79	AGTCCAGAGCCATTTCATC	59,09	AGAAACAATCCGTGCCTTG	60,11	398
2	85	CAGGCTATAGCTCAAGGAGCA	59,76	GGTCTGTGTTTCGGGATCT	58,99	310
3	45	CTGTTTTAGTCCTGTGCAGCAT	59,45	GCTTCGAGACCCAACAATC	59,85	288
4	44	AGCGCAGTGTTTTACATGA	57,03	TTTAAATTGTCAAAGGCCATTCT	59,08	295
5	239	TGGAGTGAAGAGCACAAATGC	59,99	CACAAAGAGGGAGGAAGGAA	59,25	502
6	142	TTTGTCTCCCTCCTCCCTCT	60,19	TTTCCGACACACAGACAGC	59,88	220
7	167	AAGAAGTCCTTACATGGGTTGG	59,39	CCAAAGGCTTTAAGCAAAAGG	60,23	431
8	225	CACAAGGTGTTTGCCTTCAC	59,19	GCAACCACTCGGAATGTTA	60,89	449
9	186	GAAAAGCAGTGCCCTTCAGA	60,52	CTGCAATCTGACACAATGTCC	59,15	437
UTR3'	6132	GAGGAGCCATCAAATCCAGA	60,16	CACATCAGCCTGTCTCCACT	58,83	500
		AAAAGATGGCACTTTCCATT	59,83	TTTTCTGTTCCAGCCATC	60,05	592
		GATGGGCTGGAACAGAAAA	60,05	TGCAGTCTGGGCATATCAA	60,22	706
		TTGATATGCCAGACTGCAT	59,1	CCTGGCCCTCTGTGTTACAT	59,99	678
		TGCAAGCAGCTGTTGATGT	60,61	ATTGATGCTGCCGTAAC	59,97	700
		CGTCACCATTCTTGCTGTG	59,99	ATAGCAAGGAGGGGAAAA	60,08	693
		TTTTTCCCTCCTTGCTAT	59,96	GATGGCATTCTGAACCAA	60,02	711
		AGATCATGTCCCATTTGTG	60,6	TGATTCCTTACCATCTCA	60,27	888
		CAGCTCTCTGGGCTATTG	59,97	CACAATGTGCACACTTCAA	59,14	860
		GGAGCAAGGCTGTAGTGGT	59,36	CAGGATTGATTCTCGGATG	60,42	635

Tabla XIX. Cebadores diseñados para secuenciar las regiones codificantes del gen *Pten*.

Se hicieron los alineamientos de las cadenas positivas y negativas del ratón silvestre (AA) y del ratón mutante (aa), tomando como referencia la secuencia codificante de Ensembl. La secuenciación de la región UTR5' no fue posible, debido al elevado número de secuencias repetitivas. Del resto de secuencias no se observaron mutaciones en ninguno de los exones ni en la región UTR3' (**Figura 78- A, B, C, D y E**), con excepción de algunos errores de secuencias que no se confirmaban con la cadena complementaria.

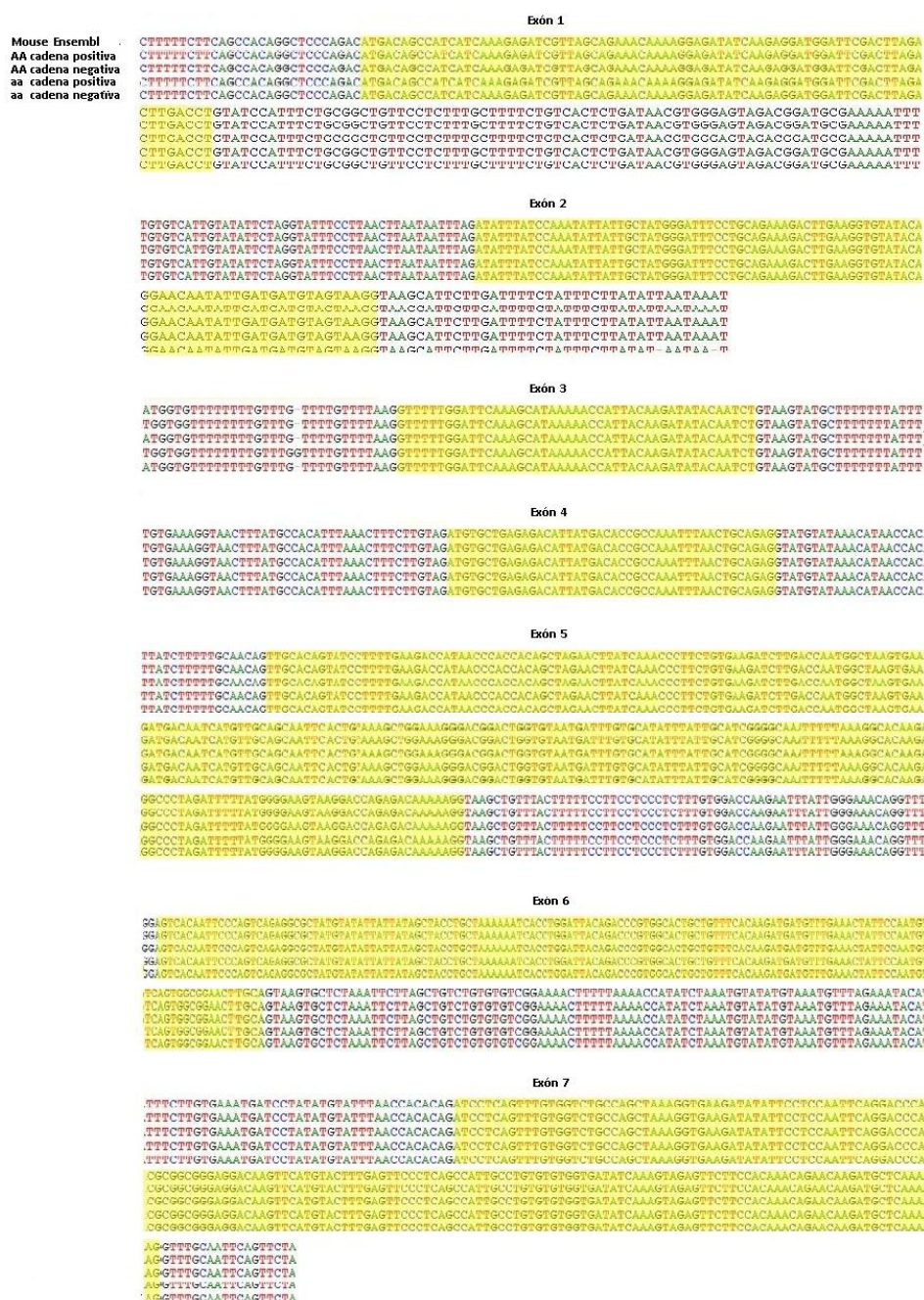


Figura 78-A. Secuencias codificantes del gen *Pten* (marcado en amarillo). Comparación de la secuencia de las cadenas positivas y negativas de un ratón homocigoto silvestre (AA) y de un ratón homocigoto mutante (aa). La primera fila se corresponde con la secuencia de referencia del genoma de ratón, seguida de las dos cadenas del ratón “AA” y a continuación de las dos cadenas del ratón “aa”.

Figura 78-B. Continuación de las secuencias codificantes del gen *Pten* (marcado en amarillo). Comparación de la secuencia de las cadenas positivas y negativas de un ratón homocigoto silvestre (AA) y de un ratón homocigoto mutante (aa). La primera fila se corresponde con la secuencia de referencia del genoma de ratón, seguida de las dos cadenas del ratón “AA” y a continuación de las dos cadenas del ratón “aa”

[illegible]

Figura 78-D. Continuación de las secuencias codificantes del gen *Pten* (marcado en amarillo). Comparación de la secuencia de las cadenas positivas y negativas de un ratón homocigoto silvestre (AA) y de un ratón homocigoto mutante (aa). La primera fila se corresponde con la secuencia de referencia del genoma de ratón, seguida de las dos cadenas del ratón “AA” y a continuación de las dos cadenas del ratón “aa”.

[illegible]

Figura 78-E. Continuación de las secuencias codificantes del gen *Pten* (marcado en amarillo). Comparación de la secuencia de las cadenas positivas y negativas de un ratón homocigoto silvestre (AA) y de un ratón homocigoto mutante (aa). La primera fila se corresponde con la secuencia de referencia del genoma de ratón, seguida de las dos cadenas del ratón “AA” y a continuación de las dos cadenas del ratón “aa”

3.4.2. Método por aproximación génica

3.4.2.1. Análisis de ligamiento genético

Para el análisis de ligamiento genético se usó un panel MD de *Illumina* de 1449 SNPs aplicado sobre 96 muestras procedentes de nueve pedigríes de ratón, parcialmente independientes, de hasta tres generaciones (93 individuos más tres muestras control) (**Figura 66**).

Los archivos de resultados de valores de polimorfismos SNPs se analizaron con dos programas informáticos de análisis de ligamiento genético: **Merlin** y **Simwalk** dando como resultado la misma región cromosómica con la máxima asociación con el fenotipo mutante.



Con la lista de los identificadores de los genes (MGI ID) y la aplicación informática **aGEM** (anatomic gene expresión mapping) (Jiménez-Lozano y col., 2009) se determinó que 185 de esos genes se expresaban en retina, de los cuales, 6 genes estaban muy expresados en retina, 88 genes tenían una expresión moderada y 90 genes una expresión baja o nula (**Tabla XX. A, B y C**).

Y con la aplicación **Genecodis** 2.0 (Carmona-Saez y col., 2007; Nogales-Cadenas y col., 2009) se dedujo que la mayoría de los genes que se encontraban en esa región participan igualmente en el transporte, formaban parte de las membranas celulares, transferasas,... (**Figura 80**).

Number of genes per concurrent annotations

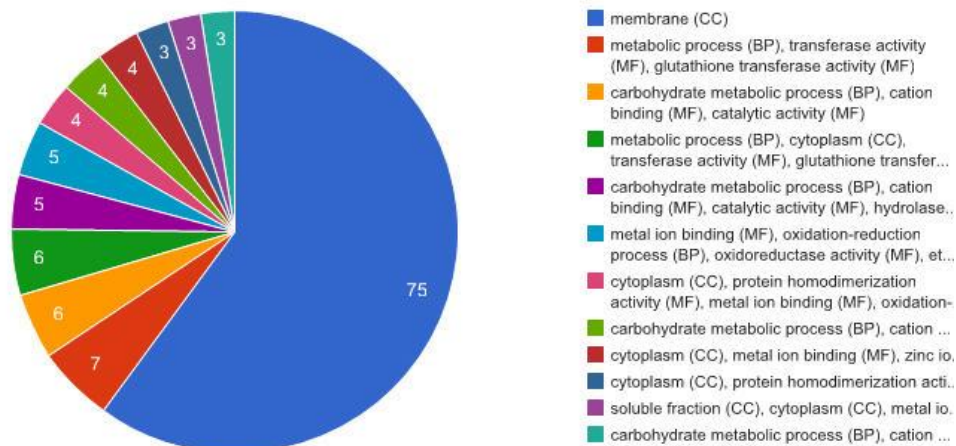


Figura 80. Gráfico de **Genecodis**, donde se agrupan los genes según sus anotaciones.

De la lista de genes obtenida por **aGEM** (**Tabla XX. A, B y C**), se seleccionaron aquellos genes que podían ser los responsables de la mutación, según la bibliografía consultada (**Tabla XXI**). Todos ellos forman parte del sistema de fototransducción, que tiene lugar en los segmentos externos de los fotorreceptores (ver apartado 3.5. de la introducción, **Figura 16**) por lo que se barajó la hipótesis de que alguno de ellos podría ser el responsable del fenotipo *coneless* observado.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Resultados

[REDACTED]

3.4.2.1.1. Análisis de la secuencia codificante

La secuenciación de las zonas codificantes, exones y regiones UTR, se hicieron del mismo modo que el gen *Pten*. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



A

B

C

D



3.4.2.2. Estudio de microsatélites

Con el objetivo de intentar acotar la región obtenida con el análisis de ligamiento genético y los polimorfismos SNPs se abordó un experimento adicional para la búsqueda de polimorfismos de microsatélites (SSLPs: *Simple Sequence Length Polimorphisms*) en esa zona, en colaboración con el laboratorio de Fernando Jose Benavides (Universidad de Texas, MD Anderson CC, Smithville, TX).

Se hizo un mapeo de autocigosidad con muestras de ADN de 36 ratones homocigotos recesivos (aa) y 36 heterocigotos (Aa), todos de las familias analizadas por análisis de ligamiento (**Figura 82**). Para ello se analizaron un total de 8 marcadores (**Tabla XXIV**), siendo todos ellos homocigotos en los dos tipos de animales (ratones normales y *coneless*).

Al salir todos los marcadores monomórficos no se pudo acotar más la región ya establecida mediante el análisis de ligamiento (**Figura 83**). Estos resultados sugerían que toda la región probablemente había viajado a lo largo de la evolución como un solo haplotipo.

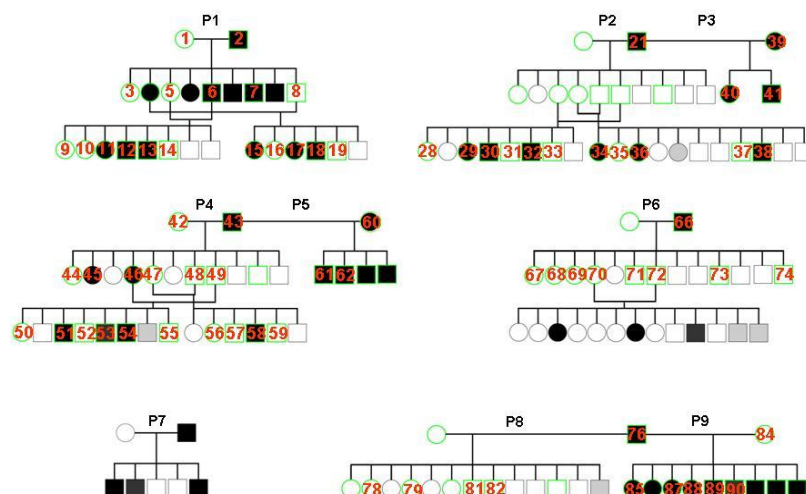


Figura 82. Selección de muestras de ADN para los ensayos de microsatélites. Se identifican con un número, los individuos analizados mediante SSLPs.

3.5. Secuenciación de los exomas

Debido a los resultados negativos que se obtuvieron mediante el análisis individualizado de algunos de los genes que se consideraban “buenos candidatos” y a la vista de la gran cantidad de genes que se expresan en retina (185) (Tabla XX-A, B y C) presentes en la región cromosómica identificada se decidió abordar una nueva metodología, que permitiera la secuenciación de toda la región problema, la mejor forma de continuar fue por secuenciación masiva.

La empresa BGI se encargó de la secuenciación de todo el exoma del genoma de ratón con la tecnología Illumina HiSeq2000 (el kit de captura: *Agilent SureSelect Mouse Exon*, 50 Mb, 50X por muestra). Se secuenciaron seis muestras de ADN: dos ratones homocigotos silvestres, dos ratones heterocigotos y dos ratones homocigotos mutantes (*coneless*).

Con ayuda de los bioinformáticos del servicio de Genómica del CNB, se filtraron los resultados de la secuenciación de cada exoma de ratón a la región candidata a contener la mutación, obtenida por el análisis de ligamiento genético. La visualización de los resultados filtrados se realizó con el programa **IGV 2.1** (Robinson y col., 2011). Se compararon los resultados filtrados (región acotada por análisis de ligamiento genético) de la secuenciación de los seis ratones con un archivo que contenía los SNPs

Resultados

polimórficos del genoma de referencia. Se buscaron aquellos polimorfismos SNPs que aparecían en los ratones mutantes *coneless* (aa) pero no en los ratones homocigotos silvestres (AA), en relación al genoma de ratón de referencia.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Resultados

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Resultados

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE RATONES ALBINOS Y PIGMENTADOS

El albinismo oculocutáneo tipo I se caracteriza por la ausencia de pigmento en el pelo, en la piel y en los ojos; este fenotipo es producido por la mutación del gen de la *tirosinasa* (Carden y col., 1998). Además de este característico fenotipo, tiene asociado una serie de anomalías en el sistema visual (Jeffery, 1997; Oetting y col., 2003).

Mediante la utilización de técnicas de transgénesis, se pueden corregir completamente las alteraciones en la pigmentación y en el sistema visual en modelos animales. La introducción de una copia funcional del gen de la *tirosinasa* en ratones albinos permitió revertir sus carencias en pigmentación y sus alteraciones visuales (Jeffery y col., 1994; 1997; Lavado y Montoliu, 2006). Estos resultados sugieren, un papel muy importante para la *tirosinasa* en el desarrollo del sistema visual de los mamíferos. La *tirosinasa* es la enzima clave de la ruta melanogénica, por lo tanto la melanina o alguno de sus metabolitos intermediarios podrían estar implicados en la regulación del desarrollo del sistema visual (Hearing, 2011).

Los estudios previos sobre albinismo realizados en el laboratorio llevaron a la generación de varios ratones transgénicos, entre ellos se encontraban los ratones YRT2 y TyrTH. El ratón YRT2, que se generó con un YAC de 250 Kb con el gen de la *tirosinasa* completo (Schedl y col., 1993), presenta un fenotipo pigmentado totalmente indistinguible de un ratón pigmentado silvestre y las alteraciones visuales características de OCAI se ven corregidas (Jeffery y col., 1994 y 1997; Giraldo y col., 1999; Giménez y col., 2001). Uno de los intermediarios resultantes de la actividad enzimática de la *tirosinasa* es la L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina). Los niveles de L-DOPA en los ojos de individuos albinos son menores debido a la ausencia de *tirosinasa* funcional y a la existencia de la barrera hematoencefálica que impide la entrada de L-DOPA, presente en la sangre, a los ojos (Illia y Jeffery, 1999). Siguiendo esta idea, se hizo en el laboratorio un ratón transgénico con un minigen de la *tirosina hidroxilasa* bajo el control de las regiones reguladoras del gen de la *tirosinasa*. La *tirosina hidroxilasa* es una enzima similar a la *tirosinasa*, participa en la ruta de síntesis de catecolaminas catalizando la oxidación de L-tirosina a L-DOPA en las células dopaminérgicas. Los ratones TyrTH se caracterizan por expresar ectópicamente el gen de la *tirosina hidroxilasa* en el EPR lo cual conlleva una corrección parcial de las anomalías visuales características de los ratones albinos, de lo que se dedujo que los niveles de L-DOPA, intermediario de la ruta de síntesis de melanina, son los responsables directa o indirectamente de la aparición de las anomalías visuales asociadas al albinismo (Lavado, 2004; Lavado y col, 2006). En estos ratones se veía corregido el déficit de bastones y las proyecciones quiasmáticas al cerebro; alteraciones características del albinismo.

A la vista de estos resultados, la primera pregunta biológica que se planteó fue: ¿La expresión génica en el sistema visual de los ratones con OCAI es diferente a la de los ratones transgénicos TyrTH (albino pero sin alteraciones visuales) e YRT2 (pigmentado y por tanto sin alteraciones visuales)? ¿Cómo influye la *tirosinasa* en el desarrollo de la retina?

Una de las formas de abordar esta pregunta es mediante el análisis de expresión diferencial de genes con la tecnología de *microarrays*. El análisis con *microarrays* permite la cuantificación del patrón de expresión de un gran número de genes de forma simultánea, y a su vez comparar los perfiles de expresión de varias muestras. Sus usos son muy diversos y están muy extendidos, por ejemplo para analizar la expresión diferencial de genes en distintos tipos de cáncer (Golub y col., 1999), para analizar la expresión diferencial de genes entre retinas normales y retinas con retinoblastoma (Ganguly y col., 2010), para el análisis diferencial de genes en distintas etapas de desarrollo (Altman y col., 2001) o para determinar que genes se expresan exclusivamente en un determinado tejido (Lockhart y Barlow, 2001).

Para poder responder a la pregunta biológica planteada se diseñó un experimento, similar a los citados anteriormente, para analizar los perfiles de expresión génica en estos tres modelos animales (ratones albinos NMRI, ratones transgénicos YRT2 y ratones transgénicos TyrTH) y en dos estadios de desarrollo (18,5 y 21,5 d.p.c) claves en el desarrollo de la retina (Marquardt y Gruss, 2002; Giménez y col., 2005), con el objetivo de identificar aquellos genes cuyos niveles de expresión se encontraran alterados en las retinas de los ratones albinos respecto a las retinas de los ratones pigmentados y de los productores de L-DOPA en la retina, con el sistema visual corregido.

El desarrollo de los distintos tipos celulares de la retina se produce en dos grandes fases; en la primera fase se diferencian las células ganglionares, las células horizontales, las células amacrinas y los conos, concluyendo aproximadamente en el estadio embrionario de 18,5 d.p.c, y en la segunda fase se diferencian los bastones, las células bipolares y las células de Müller, finalizando sobre el estadio postnatal de 21,5 d.p.c (**Figura 32**) (Marquardt y Gruss, 2002). Por este motivo se seleccionaron 18,5 y 21,5 d.p.c como los dos estadios embrionarios para la recolección del material biológico, para el estudio de perfiles de expresión génica, etapas que ya habían sido usadas con éxito anteriormente en el laboratorio (Giménez y col., 2005).

Para realizar este experimento se diseñaron un total de 56 cruces (**Tabla VIII**), entre ratones NMRI e YRT2 y entre ratones NMRI y TyrTH. Para el estudio se consiguieron un total de 82 muestras de ARN de ratones NMRI en el estadio de 18,5 d.p.c y 46 muestras en el estadio de 21,5 d.p.c; 55 muestras de ARN de ratones YRT2 en el estadio 18,5 d.p.c y 22 muestras para 21,5 d.p.c y finalmente 37 muestras de ratones TyrTH de 18,5 d.p.c y 39 de 21,5 d.p.c (**Tabla IX**). Todas estas muestras se distribuyeron en 18 combinaciones de muestras ARN (tres modelos animales, dos estadio desarrollo y por triplicado), de tal manera que cada combinación contuviera al menos ARN de diez individuos procedentes de al menos tres hembras diferentes (**Tabla X**). Con este diseño experimental se quería minimizar y normalizar la variabilidad previsible asociada a ratones no consanguíneos, en una situación similar a lo que ocurre en la población humana.

Los resultados obtenidos del experimento con *microarrays* comerciales (Affymetrix) se analizaron con **FIESTAv1.0** (Oliveros, 2007) (**Figura 35**) sin mucho éxito; pues no se observaron diferencias de expresión génica entre los seis grupos estudiados (tres modelos animales en los dos estadios de desarrollo). Todos los genes que se expresaban

en la retina parecían tener el mismo nivel de expresión, entre los distintos grupos animales, sin diferencias significativas.

A pesar de ello se buscaron referencias de los genes que tenían valores de FDR próximos a 0,05 aunque no fueran significativos en sentido estricto. De ellos se seleccionaron, para validar por PCR cuantitativa e inmunohistoquímica, a *Bassoon*, ya que juega un papel muy importante en la formación de las sinapsis en cintilla (Dresbach y col., 2001; Dick y col., 2003; Schoch y Gundelfinger, 2006) y a *Pten* que forma parte del mecanismo de regulación del ciclo celular. La supresión de *Pten* en el inicio de la neurogénesis de la retina provoca una reducción de las células ganglionares y de los bastones, pero aumenta la génesis de las células de Müller (Sakagami y col., 2012).

Debido a la falta de resultados positivos, se decidió reanalizar los resultados de perfiles de expresión con otro programa informático, **GEPASv3.1 (T-Rex)** (Montaner y col., 2006). Este programa permitía hacer análisis multiclasas, es decir, comparar en un mismo análisis los 3 modelos animales, en los dos estadios de desarrollo (con sus tres réplicas); además de poder elegir como agrupar los resultados (clases). Se hicieron tres análisis multiclasas, el primero teniendo en cuenta los tres modelos de ratón y los dos estadios de desarrollo, por lo tanto, agrupando las tres réplicas experimentales de cada ratón, en cada estadio desarrollo, en una misma clase (**Figura 37**). En el siguiente análisis se agruparon los resultados teniendo sólo en cuenta el tipo de ratón (**Figura 38**) y en el tercero atendiendo sólo a los estadios de desarrollo (**Figura 39**).

De los tres análisis multiclasas realizados con **T-Rex** sólo se observó expresión génica diferencial, en el que se agrupaban los resultados según el modelo animal (NMRI, YRT2 y TyrTH) (**Figura 38**). Observando la matriz de colores, que representa los niveles de expresión de los distintos genes (azul, menos expresión y rojo, más expresión), se identifica un patrón de expresión diferencial entre los ratones albinos NMRI y los ratones TyrTH/YRT2, los genes que generalmente están poco expresados en los ratones NMRI, se encuentran más expresados en los ratones TyrTH e YRT2 y viceversa.

En el gráfico de la **Figura 38**, además de la matriz de colores, que representa el nivel de expresión génica, se muestra una lista de genes codificados por un identificador dado por Affymetrix (e.j. 1433685_a_at) y un valor de FDR asociado. Los cuatro primeros genes de la matriz son controles de Affymetrix, por lo que los genes con una expresión diferencial estadísticamente significativa ($FDR < 0,05$) son los siete primeros, el resto están diferencialmente expresados pero sus diferencias de expresión ya no son estadísticamente significativas. A pesar de ello se decidió considerar la mayor parte de los genes de la matriz como potencialmente válidos. También se incluyeron como válidos aquellos genes que aparecieron diferencialmente expresados en el análisis con **T-REX** donde se quitó el grupo 13 por seguir un patrón de colores ligeramente diferente al de sus otras dos réplicas (**Figura 41**).

Mediante la documentación bibliográfica de los distintos genes (**Tabla XXVI**) y teniendo en cuenta los dos genes previamente seleccionados (*Bassoon* y *Pten*) se pudieron correlacionar los genes en cuatro tipos, según su función en el sistema visual:

- Genes implicados en el transporte intracelular de vesículas: *Kif1c*, *Ergic3*, *Ap3s2*, *Pitpnm2*, *Fxyd2*, *Bmf* y *Ptk2* (**Figura 88**).
- Genes implicados en la sinapsis: *Rph3a*, *Slc9a9*, *Spock2*, *Aplp1* y *Bassoon* (**Figura 89**).
- Genes implicados en ciclo celular: *Ntrk2*, *Gpr173*, *Mad1l1*, *Atn1*, *Zfp57* y *Map2k6* (**Figura 90**).
- Genes que intervienen en la muerte celular programada (apoptosis): *Pten*, *Jund1* y *Pim1* (**Figura 90**).

código ID	Símbolo	Descripción función	Bibliografía
1426850_a_at	<i>Map2k6</i>	detiene el ciclo celular	Jomary y col., 2006; Johnson, 2002
1425252_a_at	<i>Mad1l1</i>	división celular, metafase	Cheslock y col., 2005; Chan y col., 2005
1434635_at	<i>Rph3a</i>	transporte vesículas presinápticas	Mizoguchi y col., 1994; Wang y col., 1997
1426325_at	<i>Kif1c</i>	transporte retrógrado de vesículas al Golgi	Nakajima y col., 2002; Kopp y col., 2006
1421149_a_at	<i>Atn1</i>	regulación negativa de la transcripción ARN	Zhang y col., 2006; Shen y col., 2007
1449117_at	<i>Jund1</i>	regulación de la progresión del ciclo celular	Hafezi y col., 1999; Zhou y col., 2007
1450929_at	<i>Zfp57</i>	regulación negativa de la transcripción ARN	Alonso y col., 2004
1423006_at	<i>Pim1</i>	proliferación celular	Bachmann y col., 2005; Wang y col. 2001
1433719_at	<i>Slc9a9</i>	transporte	Liuzzi y Cousins, 2004
1428513_at	<i>Calcoco1</i>	regulación positiva de la transcripción ARN	Takahashi y col., 2004
1456867_x_at	<i>Ergic3</i>	transporte de vesículas del RE al Golgi	Teng y col., 2001; Roy y col., 2006
1458325_x_at	<i>Bmf</i>	regulación de la apoptosis	Puthalakath y col., 2002; Fehrenbacher y col, 2003
1443384_at	<i>Ptk2</i>	migración de neuronas	Moszczynska y col., 1994
1435857_s_at	<i>Aplp1</i>	apoptosis, adhesión celular	Chen y col., 2006
1422718_at	<i>Ap3s2</i>	transporte mediado por vesículas	Raposo y Marks, 2007; Fujita y col., 2001
1435026_at	<i>Spock2</i>	unión a calcio, matriz extracelular	Vannahme y col., 1999
1458622_at	<i>Ntrk2</i>	desarrollo fotorreceptores tipo bastones	Frade y col., 1999
1419757_at	<i>Pitpnm2</i>	transporte	Lu y col., 2001
1456601_x_at	<i>Fxyd2</i>	transporte	Geering, 2006
1429986_at	<i>Gpr173</i>	fototransducción	Vanti y col., 2003
MGI:1277955	<i>Bassoon</i>	sinapsis	Dresbach y col., 2001; Dick y col., 2003; Schoch y col., 2006
MGI:109583	<i>Pten</i>	apoptosis	Sakagami y col., 2012

Tabla XXVI. Genes diferencialmente expresados en retina, tras los análisis de **FIESTA** y **GEPAS**.

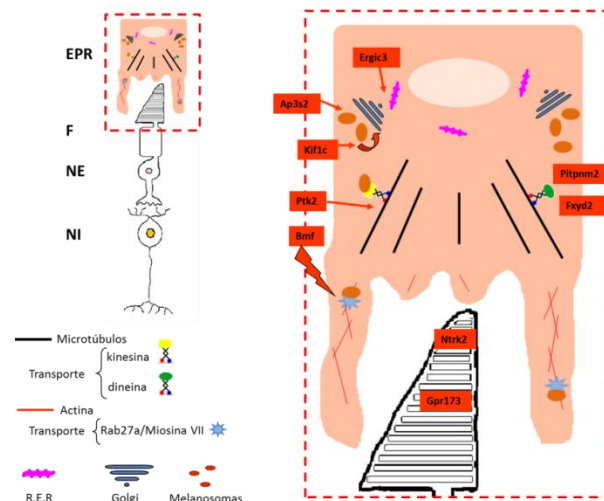


Figura 88. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en transporte intracelular con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. Epitelio pigmentado de la retina (EPR), capa de fotorreceptores (F), capa nuclear externa (NE), capa nuclear interna (NI). *Ntrk2*: diferenciación fotorreceptores durante el desarrollo celular, *Gpr173*: receptor rodopsina. *Bassoon*: sinapsis, *Bmf*: interacciona con la miosina VII, *Ergic3*: transporte vesículas/melanosomas desde RE al Golgi, *Kif1c*: transporte retrogrado hacia el Golgi, *Ap3s2*: transporte vesículas desde el Golgi, *Pitpnm2*: transporte, *Fxyd2*: transporte.

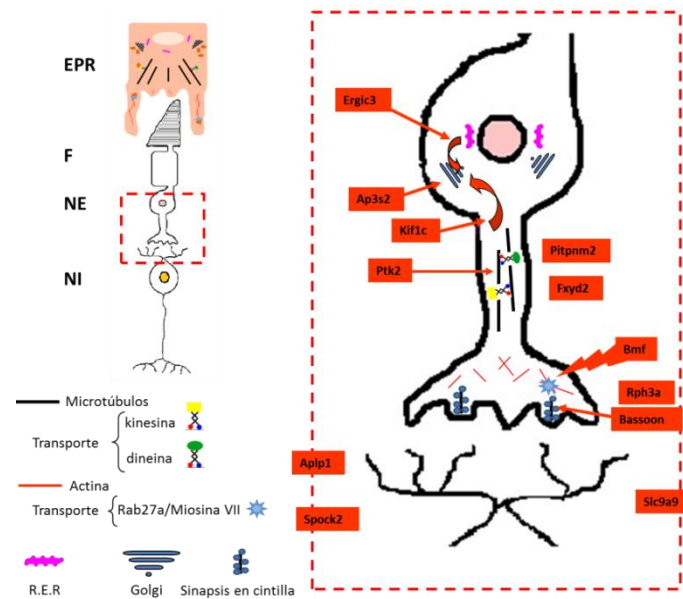


Figura 89. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en sinapsis con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. Epitelio pigmentado de la retina (EPR), capa de fotorreceptores (F), capa nuclear externa (NE), capa nuclear interna (NI). *Bassoon*: sinapsis, *Rph3a*: modulador del tráfico de vesículas sinápticas, *Bmf*: interacciona con la miosina VII, *Ergic3*: transporte vesículas/melanosomas desde RE al Golgi, *Kif1c*: transporte retrogrado hacia el Golgi, *Ap3s2*: transporte vesículas desde el Golgi, *Pitpm2*: transporte, *Fxyd2*: transporte, *Slc9a9*: transportador de sodio/hidrogeno, *Ptk2*: biogénesis y organización de los microtúbulos, *Spock2*: une a calcio, predomina neuronas postsinápticas, también implicado en la sinaptogénesis y *Aplp1*: transporte de vesículas, apoptosis.

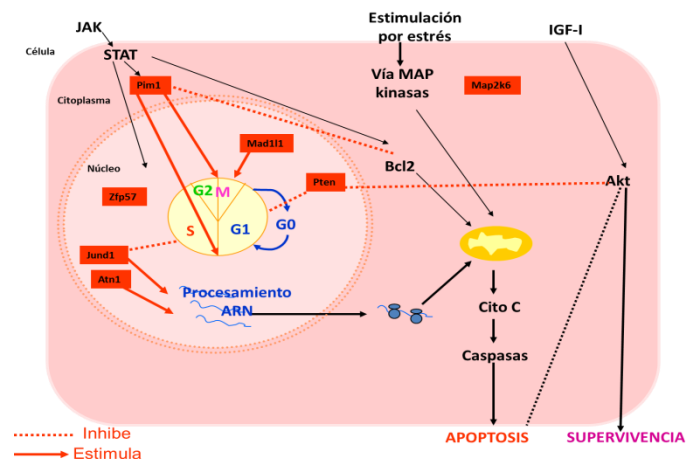


Figura 90. Representación esquemática del papel que desempeñan los genes implicados en ciclo celular y apoptosis con expresión diferencial en retinas de ratones albinos/pigmentados. *Mad111*: son represores transcripcionales de la diferenciación celular, *Atn1*: regula negativamente la transcripción de ARN, *Zfp57*: regula la replicación de la cromatina en las fases tempranas del ciclo celular, *Map2k6*: detiene el ciclo celular, *Pten*: inhibe el ciclo celular en G1; también inhibe a Akt, favoreciendo la entrada en apoptosis, *Jun1*: junto con c-fos favorece la muerte celular, núcleo, *Pim1*: favorece la proliferación y por tanto la regulación negativa de la apoptosis, por la vía JAK/STAT.

Como probablemente era de esperar, debido a la baja significación estadística de los resultados, al validar la mayoría de estos genes por PCR cuantitativa (**Figura 43 y 44**) y mediante inmunohistoquímica (**Figuras 45-53**) no se encontraron los resultados esperados; siendo muy difícil la localización de genes con expresión diferencial entre las retinas de ratones albinos y pigmentados.

En la validación de los genes por PCR cuantitativa, siguiendo el patrón de expresión obtenido por **GEPAS** (TyrTH e YRT2 tenían una expresión génica similar y opuesta a la expresión génica en NMRI), el número de moléculas de los genes analizados tendría que ser similar en TyrTH e YRT2 y diferentes a NMRI, pero en las muestras experimentales utilizadas esto no ocurría de este modo. La expresión en la mayoría de los genes analizados era similar en todos los grupos animales y en los dos estadios de desarrollo, tal y como inicialmente había detectado **FIESTA**.

La inexactitud de estos resultados podía deberse a un efecto “promedio” provocado por haber mezclado en que cada combinación de ARN (**Tabla X**), que se utilizó para hibridar con los *microarrays*, muestras de muchos embriones/crías procedentes de distintas hembras y a su vez a que cada réplica experimental procedía de camadas diferentes. Por otro lado, todos los ratones utilizados se encontraban en un fondo genético no consanguíneo (HsdWin:NMRI) por lo que muchos de sus loci están en heterocigosis. Por tanto, unas de las primeras interpretaciones de estos resultados fue que la utilización de un gran número de animales para realizar las combinaciones de ARN y que estos animales se hubieran obtenido de una colonia no consanguínea, provocó la acumulación de una gran variabilidad que influyó negativamente a la hora de hacer los perfiles de expresión génica.

En los ensayos inmunohistoquímicos, la mayoría de los anticuerpos no presentaban un marcaje claro para los cortes histológicos de las retinas en los dos estadios de desarrollo y en los tres modelos animales; sin embargo, el marcaje en la retina control era bueno aunque no específico (marcaba generalmente por igual a todas las capas de la retina). Estos resultados inmunohistoquímicos mostraban que las diferencias de expresión génica observadas en los perfiles de expresión génica no se correspondían con diferencias en la expresión a nivel de proteínas. Igualmente, no es posible descartar que el nivel de expresión en adultos (detectado en las retinas control) fuera muy superior al nivel de expresión de estos genes (y de acumulación de las proteínas) durante el desarrollo embrionario y temprano.

2. ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE VARIOS MODELOS DE ALBINISMO

En estudios electrofisiológicos preliminares realizados en el laboratorio del Prof. Pedro de la Villa con ratones NMRI y TyrTH, se observó que algunos de los ratones transgénicos TyrTH presentaban una respuesta electrorretinográfica de respuesta a conos disminuida (**Figura 53**), en relación a otros animales de la misma colonia. Por ello, se decidió hacer un estudio mas detallado de la posible implicación del transgén TyrTH en la aparente disminución de la funcionalidad de los conos. Para confirmar estas observaciones se hizo un análisis cuantitativo del número de conos en cortes histológicos de retinas de 17 ratones NMRI y 14 TyrTH (**Tabla XIII**). Los recuentos de conos se realizaron en cuatro regiones de la retina central, equidistantes al nervio óptico (**Figura 55 y 56**). Los resultados se representaron como número de conos con respecto a la distancia al nervio óptico y se calculó la recta de regresión para cada tipo de ratón (**Figura 57**). Observando las pendientes de ambas rectas se detectó una ligera tendencia, en los ratones TyrTH, a un menor número de conos con la distancia al nervio; pero estas diferencias de nuevo no eran significativas ya que los coeficientes de regresión lineal de las rectas eran próximos a 0.

Al no conseguir resultados concluyentes con los recuentos histológicos de conos, se decidió hacer nuevos análisis electrorretinográficos (por parte del Prof. Pedro de la Villa, Universidad de Alcalá de Henares). En este caso se analizaron nuevos ratones albinos NMRI y TyrTH, y además se incluyó un nuevo modelo como control positivo del experimento, los ratones transgénicos YRT2 (pigmentados, fenotipo visual normal).

En esta segunda tanda de análisis, aparecieron resultados inesperados (**Tabla XIV**). Todos los modelos animales, independientemente de la presencia/ausencia del transgén TyrTH o YRT2, presentaban un elevado número de individuos con un fenotipo electrorretinográfico de respuesta a conos nula que a partir de ese momento se denominó como *coneless*.

A partir de ese momento se cambió el planteamiento de la hipótesis de partida; los dos modelos transgénicos utilizados, tanto TyrTH como YRT2 están en fondo genético no consanguíneo HsdWin:NMRI, por tanto el nexo en común de los tres modelos utilizados para los diferentes experimentos es la colonia albina no consanguínea HsdWin:NMRI. Por lo tanto, el fenotipo *coneless* está asociado a algún locus o loci, cuyos distintos alelos están segregando en la población de ratones HsdWin:NMRI y no está asociado al transgén TyrTH como se creía al principio.

Desde el punto de vista histológico/inmunohistoquímico, los ratones con un fenotipo electrorretinográfico de respuesta a conos nula, tendrían que tener un menor número de conos. Para confirmar esta idea se seleccionaron cuatro ratones con ERGs diferentes (**Figura 58 y 59**) y se procedió a cuantificar histológicamente el número de conos. Se hizo del mismo modo que para el primer experimento de recuento de conos, añadiendo algunas modificaciones que se describen a continuación. Los ratones tienen visión lateralizada con un pequeño solapamiento central de los campos visuales (Jeffery y col., 1994), por lo que, a pesar de carecer de fovea, presentan una región de la retina con un mayor número de conos; esta región se localiza en la zona dorso-temporal del ojo

(Vugler y col., 2008). Al no presentar la retina una distribución homogénea de conos, los resultados de los contejes podrían verse afectados dependiendo de la localización de las zonas seleccionadas para realizar la cuantificación del número de conos. Por este motivo se aumentó el número de zonas de recuentos de conos, de tal manera que abarcara toda la retina media pero sin solaparse. Esta vez no se anotó la distancia al nervio óptico, aunque se hicieron todas las imágenes a, aproximadamente, la misma distancia al nervio (**Figura 60**). Estas dos modificaciones se realizaron con el objetivo de reducir la variabilidad debida a la distribución asimétrica de los conos en la retina de los ratones. Los resultados obtenidos, tanto al hacer la media de todas las zonas de conteje de cada ratón (**Figura 61** y **Tabla XV**), como teniendo sólo en cuenta la zona temporal (con mayor concentración de conos) o teniendo en cuenta la zona temporal y sus dos regiones adyacentes (**Figura 62** y **Tabla XVI**), mostraron una clara correlación entre los ERGs y el número de conos presentes en las retinas. El ratón con un ERG normal era el que presentaba un mayor número de conos, con respecto a los otros ratones con ERGs alterados, que presentaban un menor número de conos (de forma proporcional a la repuesta electroretinográfica).

Junto con los electroretinogramas, se hicieron tests optomotores para evaluar la función visual de los cuatro ratones con los que posteriormente se hicieron los recuentos histológicos de conos (**Figura 63**). El análisis de la función visual se representó como número de “cabeceos” en la dirección de giro con respecto al número de giros del cilindro. El ratón 6137 (YRT2 pigmentado) era el que presentaba mejor función visual, le seguía el ratón 6244 (YRT2 pigmentado con menos número de conos) y finalmente los ratones 6132 y 6237 (NMRI albinos). Esta disminución de la función visual se correlacionaba igualmente con las diferencias de números de conos encontradas en sus retinas y con los electroretinogramas.

Por tanto, se pudo establecer una correlación entre los tres tipos de experimentos: histológicos, electrofisiológicos y funcionales (de la Villa y col., 2007). Esta correlación demuestra que se pueden utilizar técnicas no invasivas para deducir información relevante de la estructura de la retina en animales vivos.

En paralelo a los ensayos de expresión génica y de recuento histológico de número de conos, se llevaron a cabo análisis de la ultraestructura de la retina de los ratones NMRI, TyrTH e YRT2, utilizando el servicio de Microscopía Electrónica del CNB.

Estos estudios de microscopía electrónica de transmisión se iniciaron también con el objetivo de encontrar diferencias estructurales entre la retina de los ratones NMRI, albinos con anomalías visuales (Jeffery, 1997; Oetting y col., 2003), la retina de los ratones transgénicos TyrTH, albinos sin anomalías visuales (Lavado, 2004; Lavado y col, 2006) y la retina de los ratones transgénicos YRT2, pigmentados sin anomalías visuales (Scheld y col., 1993). Se analizaron un total de seis ratones: dos NMRI y dos TyrTH y otros dos ratones transgénicos YRT2 adicionales como control, ya que presentaban un fenotipo pigmentado indistinguible de los ratones pigmentados silvestres (Scheld y col., 1993; Giraldo y col., 1999; Giménez y col., 2001).

Inicialmente, con objeto de familiarizarse con la ultraestructura de la retina de ratón, se comenzó explorando los distintos tipos celulares en secciones de una retina de un ratón YRT2 (que en su momento se consideró como ratón silvestre), tomando

microfotografías de las distintas capas de la retina (**Figura 64**) y comparándolas con las imágenes publicadas en diversas webs de referencia en microscopía, como por ejemplo:

- Webvision (<http://retina.umh.es/webvision/spanish/indice.html>)
- Retinal microscopy (<http://www.retinalmicroscopy.com/electron.html>)
- Electron microscopic atlas (<http://www.drjastrow.de/EMAtlasE.html>)

Una vez familiarizados con la ultraestructura de las distintas capas de la retina, se procedió de forma sistemática a tomar microfotografías de tres regiones de la retina (EPR, fotorreceptores y CPE), a distintos aumentos (**Figura 65**). Con todas las imágenes de los seis ratones se hizo un examen comparativo de los distintos tipos celulares y sub-celulares (**Tabla XVII**). Las observaciones realizadas de la retina dieron lugar a un descubrimiento inesperado; centrándose en la capa del EPR, se distinguieron dos tipos de retinas, independientemente de la presencia/ausencia del transgén TyrTH o YRT2: unas retinas con la estructura celular del EPR normal (**Figura 65- B, D y E**) y otras retinas con la estructura celular del EPR alterada (**Figura 65- A, C y F**). Estas observaciones sugerían que la variabilidad a nivel de la ultraestructura de la retina estaba asociada a algún locus, que estaba segregando en la población de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, con independencia de la presencia de los transgenes. Todos los resultados obtenidos de los distintos abordajes experimentales (perfiles de expresión, recuento de conos y estudios ultraestructurales) apuntaron a que había algún locus, que afectaba directamente a la función visual, cuyos distintos alelos estaban segregando en la población de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI (fondo genético en el que se encontraban todos los ratones utilizados), y que, por ello, los análisis realizados contenían una fuente de variabilidad adicional, inesperada, que impactaba de forma directa en los diseños experimentales.

Este locus polimórfico estaba alterando los resultados de todos los experimentos que se habían llevado a cabo hasta el momento, por lo que se decidió continuar con la caracterización del locus en cuestión, en la colonia de ratones albinos HsdWin:NMRI.

Este tipo de locus/loci asociados al fenotipo electrorretinográfico de respuesta a conos nula (*coneless*), con un menor número de conos desde el punto de vista histológico, y con unas alteraciones ultraestructurales muy similares a las que aparecen en varios tipos de enfermedades degenerativas de la retina, habían sido descritas en patologías de la visión anteriormente, como por ejemplo la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Kim y col., 2008; Katta y col., 2009) o la degeneración macular de Stargardt (Radu y col., 2011).

3. CARACTERIZACIÓN DE UN LOCUS ASOCIADO A UNA RETINOPATÍA EN LOS RATONES HsdWin:NMRI

El motivo por el que se eligió la colonia de ratones no consanguíneos HsdWin:NMRI para el estudio de alteraciones visuales en el albinismo OCAI, al ser esta el fondo genético en el que habían sido obtenidos todos los ratones transgénicos, modelo de albinismo, generados anteriormente (Schedl y col., 1993; Montoliu y col., 1996; Giménez y col., 2004; Lavado y col., 2006). Adicionalmente, también al considerarse que las colonias no consanguíneas de ratones son mejores modelos de enfermedades humanas, ya que representan mejor la heterogeneidad de la población humana (Chia y col., 2005; Yalcin y col., 2010), que es, obviamente, no consanguínea.

La presencia de mutaciones y la segregación de loci polimórficos en las colonias no consanguíneas de ratones puede provocar alteraciones en resultados experimentales o incluso obtener inducir a la obtención de resultados erróneos, como ha ocurrido en los experimentos de la presente tesis. Se sabe que los alelos agouti (a) segregan en muchas colonias de ratones albinos no consanguíneos, aunque solamente se manifiesten cuando están en homocigosis y en presencia de transgenes que rescatan la pigmentación (como los que existen en el laboratorio). No es infrecuente encontrar animales “negros” (nonagouti, aa) en una colonia de ratones transgénicos YRT2, en los que han coincidido dos alelos mutantes “a” del locus *Asp* (Bultman y col., 1992).

Por otra parte es bien conocido los diferentes fenotipos asociados a diferentes colonias de ratones albinos no consanguíneos, como ICR o CD-1, especialmente en estudios de comportamiento (Adams y col., 2002; Gerlai y col., 2002; Patil y col., 2009), lo cual indica la existencia de mutaciones distintas segregando en estas colonias de ratones.

Igualmente ocurre en ratones consanguíneos, por ejemplo, estudios recientes han identificado la mutación *rd8* del gen *Crb1* en varias colonias de ratones C57B/6N y en células ES, ampliamente utilizados por la comunidad científica (Mattapallil y col., 2012; Proyecto IKMC: www.knockoutmouse.org). El gen *Crb1* codifica para una proteína transmembrana esencial para el mantenimiento de la integridad y de la morfogénesis de los fotorreceptores en la retina de los mamíferos; mutaciones de este gen provocan retinopatías tales como la retinitis pigmentosa y la amaurosis congénita de Leber (Mehalow y col., 2003).

3.1. Análisis de ligamiento genético

Ante los nuevos resultados obtenidos la nueva pregunta biológica que se intentó responder fue: ¿Existe un locus o loci, asociado a una retinopatía, que está segregando en la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI?

Para el abordaje experimental se pensó en hacer un análisis de ligamiento genético (análisis de asociación de loci genéticos que tienden a heredarse juntos) mediante la búsqueda de polimorfismos de SNPs (mutaciones de un par de bases) que cosegregaban con la mutación, para acotar la zona del genoma de ratón donde se localiza el locus o loci polimórficos causales del fenotipo *coneless*. Para ello, lo primero que se hizo fue conseguir una pequeña colonia de ratones HsdWin:NMRI con fenotipo conocido. Se enviaron 55

ratones HsdWin:NMRI al laboratorio del Prof. Pedro de la Villa para su análisis electroretinográfico. Con estos animales fenotipados y agrupados en dos clases: retina normal y *coneless*, se establecieron una serie de cruces en el animalario de la Universidad de Alcalá de Henares con el objetivo de conseguir pedigríes independientes de al menos dos generaciones para utilizar en los análisis de ligamento genético. También se fijaron ojos de algunos de sus miembros para análisis histológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales (MET). Se consiguió establecer nueve pedigríes con todos sus miembros fenotipados y con individuos de tres generaciones (F0, F1 y F2). Cuatro de los pedigríes parcialmente independientes (**Figura 66**) ya que compartían uno de los progenitores (P2 y P3, P4 y P5).

Al examinar la distribución y herencia del fenotipo *coneless* en los árboles genealógicos de los nueve pedigríes se dedujo que éste debía corresponder a una mutación monogénica, autosómica y recesiva, confirmándose estadísticamente la distribución observada de herencia simple mendeliana frente a los casos experimentales; utilizando para ello el test de la χ^2 (Montoliu, 2012). A los ratones homocigotos salvajes se los denominó “AA”, a los ratones homocigotos mutantes “aa” (fenotipo *coneless*) y a los ratones heterocigotos “Aa”; donde “A” es el alelo silvestre y “a” es el alelo mutado.

De todos los miembros de los nueve pedigríes establecidos, se seleccionaron 96 (**Figura 66**, marcados en verde) para hacer los análisis de ligamiento genético, que se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), en su nodo ubicado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Se utilizó para el análisis de ligamiento un panel de media densidad de *Illumina* con 1449 SNPs distribuidos en los 20 cromosomas de ratón (**Figura 29**). Este panel ya había sido usado con éxito en el laboratorio para describir las diferencias en el genotipo de varias subcepas C57BL/6 procedentes de distintos proveedores. Estos resultados son fundamentales para el correcto seguimiento genético de las colonias de ratones transgénicos y *knock-out* que estén producidas en subcepas C57BL/6 (Zurita y col., 2011).

El experimento de ligamiento genético llevo mucho tiempo en poder completarse. Durante el tiempo de espera hasta la obtención de los resultados del análisis de ligamiento genético se seleccionaron algunos genes candidatos que, según su fenotipo relacionado, pudieran explicar la mutación. Uno de los genes que primero se seleccionó como posible gen candidato a portar la mutación *coneless*, fue el gen *Pten*.

Esta elección se basó en los resultados de unos ensayos inmunohistoquímicos que se llevaron a cabo contra *Pten*, en retinas de ratones normales y *coneless*. Los resultados mostraron que la retina del ratón normal presentaba mayor expresión de *Pten* que la retina del ratón *coneless* en la capa de células ganglionares y que la retina *coneless* tenía mayor expresión en el EPR que la retina normal (**Figura 76**). Por otro lado, en Kim y col. (2008) se demuestra la importancia de *Pten* en el mantenimiento de las uniones célula a célula del EPR. La delección del gen provoca la pérdida de estas uniones íntimas, la alteración de la estructura del EPR y como consecuencia de esto, se produce una progresiva muerte de los fotorreceptores. En este artículo se muestran microfotografías del EPR de ratones *knock-out* para *Pten* con alteraciones ultraestructurales del EPR muy

Discusión

similares a las que se observan en los experimentos de microscopía electrónica realizados con ratones NMRI, TyrTH e YRT2 (**Figura 65**).

Se secuenciaron por el método de Sanger todas las regiones codificantes del gen *Pten* (**Figura 77**), en un ratón homocigoto salvaje (AA) y en uno homocigoto recesivo (aa); se alinearon todas las secuencias obtenidas y se compararon con la secuencia de referencia del genoma de ratón obtenida de Ensembl (**Figura 78-A, B, C, D y E**) sin observarse ningún tipo de mutación asociada al ratón *coneless*.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

3.2. Estudio de microsatélites

[REDACTED]

donde se localizaba la mutación que provocaba el fenotipo *coneless*, se utilizó la cartografía de autocigosidad (White y col., 2007) en colaboración con el laboratorio de Fernando Jose Benavides (Universidad de Texas, MD Anderson CC, Smithville, TX). Este estudio consistió en la búsqueda de posibles polimorfismos de microsatélites (secuencias de ADN que se repiten de manera consecutiva; la variación del número de repeticiones conforman los diferentes alelos) en la región ya delimitada del cromosoma 3 que ayudaran a reducir la región de búsqueda. Para ello se analizaron ocho marcadores (**Tabla XXIV**), en 36 ratones con fenotipo normal (AA o Aa) y 36 ratones con fenotipo *coneless* (aa), siendo todos ellos monomórficos (**Figura 83**).

De estos análisis de autocigosidad se concluye que la región delimitada por el análisis de ligamiento es una región altamente conservada por lo que tiende a heredarse junta, como un solo haplotipo. Se sabe que las colonias de ratones no consanguíneos contienen una variabilidad limitada y que grandes segmentos de su genoma son relativamente uniformes (Yalcin y col., 2010), como se pudo comprobar en esta región del cromosoma 3.

3.3. Secuenciación de los exomas

A la vista de la gran cantidad de genes con expresión en retina existentes en la región acotada por el análisis de ligamiento, de los resultados negativos obtenidos haciendo el análisis individualizado de posibles genes candidatos y ante la imposibilidad de acotar más la región contenedora del locus polimórfico se decidió secuenciar toda la región mediante una estrategia de secuenciación masiva. La empresa BGI se encargó de secuenciar el exoma del genoma de seis ratones, dos ratones homocigotos silvestres (AA), dos heterocigotos (Aa) y dos homocigotos mutantes (aa) y de anotar la existencia

Discusión

de polimorfismos genéticos a lo largo de todas las regiones codificantes del genoma de ratón.

Con ayuda de los bioinformáticos del servicio de Genómica del CNB y con el programa **IGV 2.1** (Robinson y col., 2011) se filtraron los polimorfismos de la región acotada por el análisis de ligamiento genético de los seis exomas secuenciados y se procedió a la interpretación de los resultados. Con las tablas de polimorfismos de los dos ratones homocigotos silvestres (AA, fenotipo normal) y de los dos ratones mutantes (aa, fenotipo *coneless*), y con la tabla de polimorfismos del genoma de ratón de referencia se procedió a comparar los polimorfismos de los ratones silvestres “AA”, de la región delimitada y que aparecían en el genoma de referencia, con los polimorfismos de los ratones mutantes *coneless* “aa”.

[Redacted text block containing multiple paragraphs of blacked-out content]

Discusión

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out content]

4. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LAS RETINAS NORMALES Y *CONELESS*

Paralelamente a los estudios genéticos para la búsqueda de locus causal del fenotipo *coneless*, se hicieron varios estudios estructurales con algunas de las retinas de los ratones que formaban parte de los pedigrís establecidos para el análisis de ligamiento genético.

Se hizo un estudio histológico de alta resolución (cortes historesina) de las retinas de ratones con fenotipo normal y con fenotipo *coneless*. En el examen visual de la imágenes de microscopía de campo claro se pudo distinguir la presencia de grandes vacuolas en el EPR y una desorganización de los extremos marginales de los SEF en las retinas *coneless* que no aparecían en las retinas normales (**Figura 67**) tal y como se había visto anteriormente mediante microscopía electrónica.

Como ya se demostró con los experimentos de recuento de conos, los ratones *coneless* tienen un menor número de conos en sus retinas. Las retinas de los ratones presentan dos tipos de conos, los conos L-M y los conos-S, dependiendo de la longitud de onda a la que absorba la luz la opsina que contengan (apartado 3.4.2 de la introducción). Atendiendo a estas dos ideas surgió la siguiente pregunta, ¿Hay algún tipo de cono más afectado que otro en los ratones con fenotipo *coneless*?

Para responder a esta pregunta se realizaron ensayos inmunohistoquímicos, con anticuerpos específicos para los dos tipos de conos, en preparaciones de retinas enteras de ratones normales y *coneless* (**Figuras 68 y 69**).

Teniendo en cuenta que el patrón de distribución de los dos tipos de conos en las retinas de los ratones siguen un gradiente dorso-ventral opuesto (**Figura 10**) (Vugler y col., 2008; Swaroop y col., 2010) y que los conos M-L, contienen opsina M-L y algunos de ellos también opsina S, y los conos S, contienen un opsina S exclusiva de ellos (**Figura 91**) (Haverkamp y col., 2005), se procedió analizar las imágenes obtenidas por microscopía confocal.

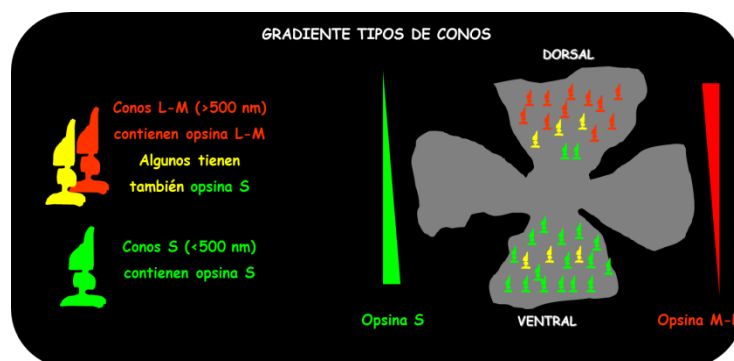


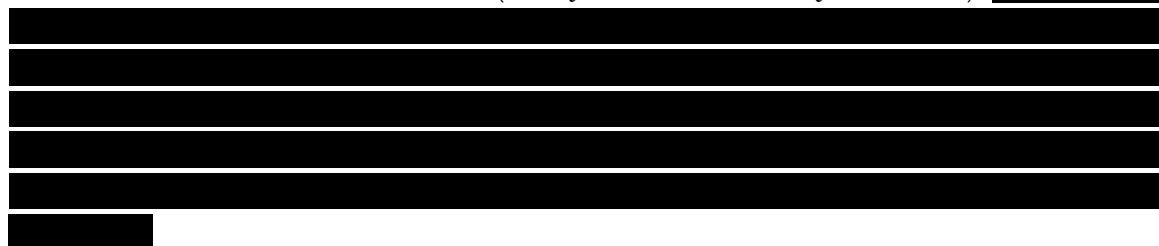
Figura 91. Representación de los gradientes de distribución de los tipos de conos en la retina de los ratones. Código de colores del marcaje inmunohistoquímico utilizado en los ensayos.

La retina *coneless* presentaba aproximadamente el mismo número de conos L-M, que sólo contenían opsina M-L (marcados en rojo), y de conos L-M, con opsinas M-L y S (marcados en amarillo) que la retina normal. Sin embargo, si se observó un menor número de conos S (marcados en verde). Por lo tanto, el fenotipo electroretinográfico de respuesta a conos nula (*coneless*) parece que se debe a que hay un menor número de conos de longitud de onda más corta (conos S/azules).

Para confirmar la correlación entre la ultraestructura alterada del EPR, observada en los primeros experimentos de microscopía electrónica de transmisión, y el fenotipo electroretinográfico *coneless*, se hicieron nuevas preparaciones de ojos de ratones HsdWin:NMRI de distintas edades. Se analizaron 9 retinas de ratones normales y *coneless* procedentes de los pedigrís establecidos para el análisis de ligamiento (**Tabla XIX**). Al comparar ambos tipos de retinas, normales y *coneless*, se identificaron los mismos tipos de estructuras degenerativas que se habían observado con los primeros experimentos de MET (**Figura 65**); con la diferencia de que en las retinas analizadas en este experimento se conoce el fenotipo electroretinográfico. Por lo que fue posible correlacionar las retinas con estructuras degenerativas con el fenotipo electroretinográfico *coneless* (**Figura 70**).

El EPR de los ratones *coneless* se caracterizaba por presentar núcleos picnóticos, engrosamiento de la membrana de Bruch, un elevado número de gránulos de lipofucsina, grandes vacuolas con aspecto vacío, pérdida de adhesión en las uniones íntimas célula a célula y acumulación de detritus membranosos (**Figura 70- B, D y F; Figura 71- B, D, F y H**); todas ellas características de retinas degenerativas (Fernández y col., 2001; Zeiss, 2010; Zhao y col., 2011). En contraste con el EPR de los ratones normales, que salvo por la ausencia de melanosomas cargados con melanina (ratones albinos), tienen el mismo aspecto que las retinas de ratones silvestres (**Figuras 70- A, C y E; Figura 71- A, C, E y G**).

Este tipo de estructuras patológicas, observadas en las retinas de estos ratones, son características de degeneraciones retinianas asociadas al envejecimiento, donde se produce, entre otras alteraciones, un aumento del estrés oxidativo, una desorganización de los fotorreceptores, el envejecimiento del EPR y la acumulación de detritus membranosos. Un ejemplo de este tipo de degeneración retiniana es la degeneración macular asociada a la edad o DMAE (Kim y col., 2008; Katta y col., 2009).



Por otro lado, también se encontraron diferencias en la capa plexiforme externa de retinas normales y *coneless*; concretamente en los terminales presinápticos de los

Discusión

fotorreceptores. Las retinas *coneless* presentaban menor acumulación de vesículas presinápticas, esta diferencia se hacía más patente en los pedículos de los conos (**Figura 72 y 73**). Estas observaciones confirman que los conos, en las retinas de los ratones *coneless*, muy posiblemente no sean funcionales, debido a la mutación del gen *Gnat2* (descubierta por los análisis genéticos), y por tanto no transmiten adecuadamente la señal eléctrica.

De un último ensayo inmunohistoquímico, con retinas normales y *coneless*, para estudiar las dos principales conexiones sinápticas existentes en la capa plexiforme externa (sinapsis entre las células bipolares y los fotorreceptores y sinapsis entre las células horizontales y los fotorreceptores) se pudo concluir que, por un lado que las retinas albinas, tanto normales como *coneless*, tienen menos conexiones sinápticas que la retinas pigmentadas (probablemente relacionado con el déficit de fotorreceptores que es conocido y asociado al albinismo (Jeffery y col., 1997); y por otro lado las imágenes de las retinas *coneless* sugieren que hay más conexiones sinápticas que las retinas normales, quizá como mecanismo compensatorio para intentar suplir la falta de funcionalidad de los conos (**Figuras 74 y 75**).

- I. Los resultados de los análisis de expresión diferencial génica en los tres modelos de ratón estudiados muestran que determinados genes de transporte intracelular, ciclo celular y apoptosis tienen distinta expresión en los ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI con respecto a los modelos transgénicos YRT2 (fenotipo pigmentado indistinguible de los ratones silvestres) y TyrTH (con producción ectópica de L-DOPA en células del epitelio pigmentado de la retina basada en la tirosina hidroxilasa).
- II. Sin embargo, Los resultados de expresión diferencial de genes no tuvieron la significación estadística que podrían haber tenido debido muy posiblemente, a que todos los ratones transgénicos están en un fondo genético HsdWin:NMRI, colonia de ratones no consanguíneos con distintos alelos que segregan en la población y que afectan a la función visual.
- III. Algunos ratones de la colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI presentan un fenotipo histológico y electrofisiológico de alteración de los conos (fenotipo *coneless*), independientemente de la presencia/ausencia del transgén TyrTH o YRT2.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Abdeljalil J, Hamid M, Abdel-Mouttalib O, Stéphane R, Raymond R, Johan A, José S, Pierre C, Serge P. The optomotor response: a robust first-line visual screening method for mice. *Vision Res.* 2005 May;45(11):1439-46.

Adams B, Fitch T, Chaney S, Gerlai R. Altered performance characteristics in cognitive tasks: comparison of the albino ICR and CD1 mouse strains. *Behav Brain Res.* 2002 Jul 18;133(2):351-61.

Adly MA, Spiwoks-Becker I, Vollrath L. Ultrastructural changes of photoreceptor synaptic ribbons in relation to time of day and illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Sep;40(10):2165-72.

[REDACTED]

Alonso MB, Zoidl G, Taveggia C, Bosse F, Zoidl C, Rahman M, Parmantier E, Dean CH, Harris BS, Wrabetz L, Müller HW, Jessen KR, Mirsky R. Identification and characterization of ZFP-57, a novel zinc finger transcription factor in the mammalian peripheral nervous system. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25653-64. Epub 2004 Apr 7.

Altmann CR, Bell E, Sczyrba A, Pun J, Bekiranov S, Gaasterland T, Brivanlou AH. Microarray-based analysis of early development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 2001 Aug 1;236(1):64-75.

Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, Hearing VJ. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J Invest Dermatol.* 2007 Apr;127(4):751-61. Epub 2007 Jan 11

Bachmann M, Möröy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):726-30.

Barhoum R. Caracterización estructural y electrofisiológica de la degeneración retiniana en ratones Rd. Tesis Doctoral. 2006 Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.

Barral DC, Seabra MC. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 2004 Apr;17(2):111-8.

Bassi MT, Schiaffino MV, Renieri A, De Nigris F, Galli L, Bruttini M, Gebbia M, Bergen AA, Lewis RA, Ballabio A. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):13-9.

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MFW, Fisher EMC. Genealogies of mouse inbred strains. *Nature Genetics* 2000, 24: 23-25

- Beermann F, Schmid E, Ganss R, Schütz G, Ruppert S. Molecular characterization of the mouse tyrosinase gene: pigment cell-specific expression in transgenic mice. *Pigment Cell Res.* 1992 Nov;5(5 Pt 2):295-9
- Benavides F, Glasscock E, Coghlan LG, Stern MC, Weiss DA, Conti CJ. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Lab Anim.* 2001 Apr;35(2):157-62.
- Bharti K, Nguyen MT, Skuntz S, Bertuzzi S, Arnheiter H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res.* 2006 Oct;19(5):380-94.
- Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Jan;29(1):1-18. Epub 2009 Sep 10
- Bosch E, Horwitz J, Bok D. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem.* 1993 Feb;41(2):253-63.
- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 1998 May;38(10):1385-97.
- Brem G, Besenfelder U, Aigner B, Müller M, Liebl I, Schütz G, Montoliu L. YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol Reprod Dev.* 1996 May;44(1):56-62.
- Brooks MJ, Rajasimha HK, Roger JE, Swaroop A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and *Nrl*(-/-) retinal transcriptomes. *Mol Vis.* 2011;17:3034-54.
- Buchsbaum G, Gottschalk A. Trichromacy, opponent colours coding and optimum colour information transmission in the retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1983 Nov 22;220(1218):89-113.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992 Dec 24;71(7):1195-204.
- Carden SM, Boissy RE, Schoettker PJ, Good WV. Albinism: modern molecular diagnosis. *Br J Ophthalmol.* 1998 Feb;82(2):189-95.
- Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):R3.
- Chan GK, Liu ST, Yen TJ. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol.* 2005 Nov;15(11):589-98. Epub 2005 Oct 7.

Chen Y, Tang BL. The amyloid precursor protein and postnatal neurogenesis/neuroregeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 3;341(1):1-5. Epub 2006 Jan 5.

Cheslock PS, Kemp BJ, Boumil RM, Dawson DS. The roles of MAD1, MAD2 and MAD3 in meiotic progression and the segregation of nonexchange chromosomes. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):756-60. Epub 2005 Jun 12.

Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EM. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet*. 2005 Nov;37(11):1181-6.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007 Apr;21(4):976-94.

Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res*. 2010 Aug;91(2):273-85. Epub 2010 Jun 1.

de la Villa P, Barhoum R, Zurita E, Montoliu L. Functional Cone Deficit in Albino Outbred NMRI/Ha Mice. E-1284. *ARVO* 1997.

de la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A. L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J Neurosci*. 1995 May;15(5 Pt 1):3571-82.

Dessinioti C, Stratigos AJ, Rigopoulos D, Katsambas AD. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp Dermatol*. 2009 Sep;18(9):741-9. Epub 2009 Jun 23.

Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron*. 2003 Mar 6;37(5):775-86.

Diederen RM, La Heij EC, Markerink-van Ittersum M, Kijlstra A, Hendrikse F, de Vente J. Selective blockade of phosphodiesterase types 2, 5 and 9 results in cyclic 3'5' guanosine monophosphate accumulation in retinal pigment epithelium cells. *Br J Ophthalmol*. 2007 Mar;91(3):379-84. Epub 2006 Aug 30.

Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED. The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jan;58(1):94-116.

Easty DJ, Gray SG, O'Byrne KJ, O'Donnell D, Bennett DC. Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Jun;24(3):446-61. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00836.x.

Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci.* 2009 Sep 15;10(9):4066-87.

Fehrenbacher KL, Boldogh IR, Pon LA. Taking the A-train: actin-based force generators and organelle targeting. *Trends Cell Biol.* 2003 Sep;13(9):472-7.

Fernández P, Teutsch P, Maldonado MJ, Moreno-Montañés J, Rodríguez JA, García-Layana A. [Ultrastructural changes of the retinal pigment epithelium in pigs fed with a fat rich diet]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2001 Feb;76(2):125-32.

Fishman, G.A.; Birch, D.G.; Holder, G.E.; Brigell, M.G. En: *Ophthalmology Monographs*, Ed. The Foundation of The American Academy of Ophthalmology Electrophysiologic Testing. In *Disorders of the retina, Optic Nerve, and Visual Pathway*, Cap. 1, Singapore 2001.

Forns N. Estudio conductual y estructural del sistema visual del ratón Rd10. Tesis Doctoral. 2008 Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.

Frade JM, Bovolenta P, Rodríguez-Tébar A. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech.* 1999 May 15-Jun 1;45(4-5):243-51.

Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol.* 2010;93:61-84.

Fujita H, Sasano E, Yasunaga K, Furuta K, Yokota S, Wada I, Himeno M. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2001 Nov;6(1):19-24.

Futter CE, Ramalho JS, Jaissle GB, Seeliger MW, Seabra MC. The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2004 May;15(5):2264-75. Epub 2004 Feb 20.

Ganguly A, Shields CL. Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina. *Mol Vis.* 2010 Jul 13;16:1292-303.

García-Borrón JC y Olivares-Sánchez MC. En: *Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions*, ed. Jan Borovansky and Patrick A. Riley, Cap. 4. Melanins and melanosomes Wiley-Blackwell 2011.

Gardner JM, Nakatsu Y, Gondo Y, Lee S, Lyon MF, King RA, Brilliant MH. The mouse pink-eyed dilution gene: association with human Prader-Willi and Angelman syndromes. *Science.* 1992 Aug 21;257(5073):1121-4.

Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Feb;290(2):F241-50.

Gerlai R, Adams B, Fitch T, Chaney S, Baez M. Performance deficits of mGluR8 knockout mice in learning tasks: the effects of null mutation and the background genotype. *Neuropharmacology*. 2002 Aug;43(2):235-49.

Giménez E, Giraldo P, Jeffery G, Montoliu L. Variegated expression and delayed retinal pigmentation during development in transgenic mice with a deletion in the locus control region of the tyrosinase gene. *Genesis*. 2001 May;30(1):21-5.

Giménez E, Lavado A, Giraldo P, Cozar P, Jeffery G, Montoliu L. A transgenic mouse model with inducible Tyrosinase gene expression using the tetracycline (Tet-on) system allows regulated rescue of abnormal chiasmatic projections found in albinism. *Pigment Cell Res*. 2004 Aug;17(4):363-70.

Giménez E, Lavado A, Giraldo P, Montoliu L. Tyrosinase gene expression is not detected in mouse brain outside the retinal pigment epithelium cells. *Eur J Neurosci*. 2003 Nov;18(9):2673-6.

Giménez E, Lavado A, Jeffery G, Montoliu L. Regional abnormalities in retinal development are associated with local ocular hypopigmentation. *J Comp Neurol*. 2005 May 16;485(4):338-47.

Giménez E, Montoliu L. A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Lab Anim*. 2001 Apr;35(2):153-6.

Giolli RA, Guthrie MD. The primary optic projections in the rabbit-an experimental degeneration study *J.Comp.Neur*. 1969 136:99-126

Giraldo P, Giménez E, Montoliu L. The use of yeast artificial chromosomes in transgenic animals: expression studies of the tyrosinase gene in transgenic mice. *Genet Anal*. 1999 Nov;15(3-5):175-8.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.

Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Nov 2;2:43.

Guillery RW. An abnormal retinogeniculate projection in Siamese cats. *Brain Res*. 1969 Aug;14(3):739-41.

Guillery RW. An abnormal retinogeniculate projection in the albino ferret (*Mustela furo*). *Brain Res*. 1971 Oct 29;33(2):482-5.

Hafezi F, Grimm C, Wenzel A, Abegg M, Yaniv M, Remé CE. Retinal photoreceptors are apoptosis-competent in the absence of JunD/AP-1. *Cell Death Differ.* 1999 Oct;6(10):934-6.

Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Künér T, Augustine GJ, Feng G, Euler T. The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci.* 2005 Jun 1;25(22):5438-45.

Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol.* 2011 Nov 17;131(E1):E8-E11.

Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux M, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC. Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009 Oct;22(5):623-34.

Hirobe T, Wakamatsu K, Ito S. Changes in the proliferation and differentiation of neonatal mouse pink-eyed dilution melanocytes in the presence of excess tyrosine. *Pigment Cell Res.* 2003 Dec;16(6):619-28.

Horsford DJ, Nguyen MT, Sellar GC, Kothary R, Arnheiter H, McInnes RR. Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development.* 2005 Jan;132(1):177-87. Epub 2004 Dec 2.

Hutton SM, Spritz RA. A comprehensive genetic study of autosomal recessive ocular albinism in Caucasian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Mar;49(3):868-72.

Illia M, Jeffery G. Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle: analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinæ. *J Comp Neurol.* 1999 Mar 15;405(3):394-405.

Jackson IJ, Bennett DC. Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(18):7010-4.

Jeffery G, Brem G, Montoliu L. Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997 Mar 17;99(1):95-102.

Jeffery G, Schütz G, Montoliu L. Correction of abnormal retinal pathways found with albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice. *Dev Biol.* 1994 Dec;166(2):460-4.

Jeffery G. The albino retina: an abnormality that provides insight into normal retinal development. *Trends Neurosci.* 1997 Apr;20(4):165-9.

Jiménez-Lozano N, Segura J, Macías JR, Vega J, Carazo JM. aGEM: an integrative system for analyzing spatial-temporal gene-expression information. *Bioinformatics*. 2009 Oct 1;25(19):2566-72.

Johnson G. Signal transduction. Scaffolding proteins--more than meets the eye. *Science*. 2002 Feb 15;295(5558):1249-50.

Jomary C, Cullen J, Jones SE. Inactivation of the Akt survival pathway during photoreceptor apoptosis in the retinal degeneration mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Apr;47(4):1620-9.

Katta S, Kaur I, Chakrabarti S. The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. *J Genet*. 2009 Dec;88(4):425-49.

Kerov VS, Natochin M, Artemyev NO. Interaction of transducin-alpha with LGN, a G-protein modulator expressed in photoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Mar;28(3):485-95.

Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Feb;25(1):8-15.

Kim JW, Kang KH, Burrola P, Mak TW, Lemke G. Retinal degeneration triggered by inactivation of PTEN in the retinal pigment epithelium. *Genes Dev*. 2008 Nov 15;22(22):3147-57. Epub 2008 Nov 7.

King RA, Pietsch J, Fryer JP, Savage S, Brott MJ, Russell-Eggitt I, Summers CG, Oetting WS. Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet*. 2003 Nov;113(6):502-13. Epub 2003 Sep 10.

King RA, Willaert RK, Schmidt RM, Pietsch J, Savage S, Brott MJ, Fryer JP, Summers CG, Oetting WS. MC1R mutations modify the classic phenotype of oculocutaneous albinism type 2 (OCA2). *Am J Hum Genet*. 2003 Sep;73(3):638-45. Epub 2003 Jul 22.

[REDACTED]

Kopp P, Lammers R, Aepfelbacher M, Woehlke G, Rudel T, Machuy N, Steffen W, Linder S. The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell*. 2006 Jun;17(6):2811-23. Epub 2006 Mar 22.

Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7473-7.

Lam, Byron L. *Electrophysiology of Vision: Clinical Testing and Applications*. Boca Ratón, FL. Ed. Taylor & Francis Group, 2005.

Larhammar D, Nordström K, Larsson TA. Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 Oct 12;364(1531):2867-80.

Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem*. 2006 Feb;96(4):1201-11.

Lavado A, Matheu A, Serrano M, Montoliu L. A strategy to study tyrosinase transgenes in mouse melanocytes. *BMC Cell Biol*. 2005 Apr 12;6(1):18.

Lavado A, Montoliu L. New animal models to study the role of tyrosinase in normal retinal development. *Front Biosci*. 2006 Jan 1;11:743-52.

Lavado A. Modelos animales para el estudio funcional del gen de la tirosinasa de ratón y de las consecuencias asociadas a su mutación en el sistema visual de los mamíferos. Tesis Doctoral, 2004. Universidad Autónoma de Madrid.

Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:151-72.

Lockhart DJ, Barlow C. Expressing what's on your mind: DNA arrays and the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jan;2(1):63-8.

Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol*. 2008 Sep 30;6(9):e236.

Lu C, Peng YW, Shang J, Pawlyk BS, Yu F, Li T. The mammalian retinal degeneration B2 gene is not required for photoreceptor function and survival. *Neuroscience*. 2001;107(1):35-41.

Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P, Velasco A. The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res*. 2011 Nov;93(5):607-17. Epub 2011 Jul 30.

Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci*. 2002 Jan;25(1):32-8.

Martínez-Morales JR, Rodrigo I, Bovolenta P. Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*. 2004 Jul;26(7):766-77.

Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, Zhao H, Roychoudhury J, Ferguson TA, Caspi RR. The rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Apr 3. [Epub ahead of print]

Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. CRB1 is

essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 1;12(17):2179-89. Epub 2003 Jul 15

Mizoguchi A, Yano Y, Hamaguchi H, Yanagida H, Ide C, Zahraoui A, Shirataki H, Sasaki T, Takai Y. Localization of Rabphilin-3A on the synaptic vesicle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 15;202(3):1235-43.

Montaner D, Tárraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana M, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 2006 34: W486-W491

Montoliu L, Umland T, Schütz G. A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J.* 1996 Nov 15;15(22):6026-34.

Montoliu L. En: Albinismo. Una condición genética, dos realidades: España y Senegal. Editado por ALBA, asociación para la ayuda a personas con albinismo, Valencia, 2009.

Montoliu L. Generation of Transgenic Mice. A Laboratory Manual, 1997. En: <http://www.cnb.csic.es/~montoliu/transgenic.html>

Montoliu L. Mendel: a simple excel workbook to compare the observed and expected distributions of genotypes/phenotypes in transgenic and knockout mouse crosses involving up to three unlinked loci by means of a χ^2 test. *Transgenic Res.* 2012 Jun;21(3):677-81.

Montoliu L. Simple databases to monitor the generation and organisation of transgenic mouse colonies. *Transgenic Res.* 2003 Apr;12(2):251-3.

Moszczyńska A, Opas M. Involvement of non-receptor protein tyrosine kinases in expression of differentiated phenotype by cells of retinal origin. *Int J Dev Biol.* 1994 Mar;38(1):1-12.

Murillo-Cuesta S, Contreras J, Zurita E, Cedié R, Cantero M, Varela-Nieto I, Montoliu L. Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Feb;23(1):72-83. Epub 2009 Oct 19.

Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol.* 2006 May;21(5):567-78

Nakajima K, Takei Y, Tanaka Y, Nakagawa T, Nakata T, Noda Y, Setou M, Hirokawa N. Molecular motor KIF1C is not essential for mouse survival and motor-dependent retrograde Golgi apparatus-to-endoplasmic reticulum transport. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):866-73.

Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment

analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul;37(Web Server issue):W317-22.

Oetting WS, Fryer JP, Shriram S, King RA. Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. *Pigment Cell Res.* 2003 Jun;16(3):307-11.

Oetting WS, King RA. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat.* 1999;13(2):99-115.

Oetting WS. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* 2000 Oct;13(5):320-5.

Oliveros, J.C. 2007. FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates. <http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA>

Palczewski K. Chemistry and biology of vision. *J Biol Chem.* 2012 Jan 13;287(3):1612-9. Epub 2011 Nov 10.

Palmisano I, Bagnato P, Palmigiano A, Innamorati G, Rotondo G, Altimare D, Venturi C, Sviderskaya EV, Piccirillo R, Coppola M, Marigo V, Incerti B, Ballabio A, Surace EM, Tacchetti C, Bennett DC, Schiaffino MV. The ocular albinism type 1 protein, an intracellular G protein-coupled receptor, regulates melanosome transport in pigment cells. *Hum Mol Genet.* 2008 Nov 15;17(22):3487-501.

[REDACTED]

Patil SS, Sunyer B, Höger H, Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2009 Mar 2;198(1):58-68.

Pentao L, Lewis RA, Ledbetter DH, Patel PI, Lupski JR. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 14: association with autosomal recessive rod monochromacy. *Am J Hum Genet.* 1992 Apr;50(4):690-9.

Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004, 45, 4611-4616.

Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 2002 May;9(5):505-12.

Rachel RA, Mason CA, Beermann F. Influence of tyrosinase levels on pigment accumulation in the retinal pigment epithelium and on the uncrossed retinal projection. *Pigment Cell Res.* 2002 Aug;15(4):273-81.

Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, McMullen S, Travis GH, Bok D. Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem.* 2011 May 27;286(21):18593-601.

Raposo G, Marks MS. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):786-97.

Ray K, Chaki M, Sengupta M. Tyrosinase and ocular diseases: some novel thoughts on the molecular basis of oculocutaneous albinism type 1. *Prog Retin Eye Res.* 2007 Jul;26(4):323-58. Epub 2007 Jan 17.

Regales L, Giraldo P, García-Díaz A, Lavado A, Montoliu L. Identification and functional validation of a 5' upstream regulatory sequence in the human tyrosinase gene homologous to the locus control region of the mouse tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.* 2003 Dec;16(6):685-92.

Rinchik EM, Bultman SJ, Horsthemke B, Lee ST, Strunk KM, Spritz RA, Avidano KM, Jong MT, Nicholls RD. A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature.* 1993 Jan 7;361(6407):72-6.

Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011 Sep;30(5):296-323. Epub 2011 Jun 17.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011 Jan;29(1):24-6.

Rodieck, R.W. *The First Steps in Seeing*, Sinauer Associates. Massachusetts, USA, 1998.

Roy CR, Salcedo SP, Gorvel JP. Pathogen-endoplasmic-reticulum interactions: in through the out door. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):136-47.

Runkle EA, Antonetti DA. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol.* 2011;686:133-48.

Russell LB, Montgomery CS, Raymer GD. Analysis of the albino-locus region of the mouse: IV. Characterization of 34 deficiencies. *Genetics.* 1982 Mar;100(3):427-53.

Sacks O. *The Island of the Color Blind*. A.A. Knopf, 1997.

Sakagami K, Chen B, Nusinowitz S, Wu H, Yang XJ. PTEN regulates retinal interneuron morphogenesis and synaptic layer formation. *Mol Cell Neurosci.* 2012 Feb;49(2):171-83. Epub 2011 Dec 4.

Schedl A, Montoliu L, Kelsey G, Schütz G. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature.* 1993 Mar 18;362(6417):258-61.

Schoch S, Gundelfinger ED. Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res.* 2006 Nov;326(2):379-91. Epub 2006 Jul 25.

Shen Y, Lee G, Choe Y, Zoltewicz JS, Peterson AS. Functional architecture of atrophins. *J Biol Chem.* 2007 Feb 16;282(7):5037-44.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:190724. Epub 2010 Feb 17.

Simunovic MP. Colour vision deficiency. *Eye (Lond).* 2010 May;24(5):747-55. Epub 2009 Nov 20

Smith C.U.M. *Biology of Sensory Systems* Wiley-Blackwell, 2000.

Smyth, G. K., Michaud, J., and Scott, H. The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005, 21(9), 2067-2075.

Spritz RA, Strunk KM, Giebel LB, King RA. Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *N Engl J Med.* 1990 Jun 14;322(24):1724-8.

Steel KP, Davidson DR, Jackson IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development.* 1992 Aug;115(4):1111-9.

Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 2010 Aug;11(8):563-76.

Takahashi K, Inuzuka M, Ingi T. Cellular signaling mediated by calphoglin-induced activation of IPP and PGM. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 3;325(1):203-14.

Teng FY, Wang Y, Tang BL. The syntaxins. *Genome Biol.* 2001 2001;2(11):REVIEWS3012. Epub 2001 Oct 24.

Tom Dieck S, Brandstätter JH. Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res.* 2006 Nov;326(2):339-46. Epub 2006 Jun 15.

- Tomita Y, Takeda A, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S. Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Nov 15;164(3):990-6.
- Tsybovsky Y, Molday RS, Palczewski K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv Exp Med Biol*. 2010;703:105-25.
- Vannahme C, Schübel S, Herud M, Gösling S, Hülsmann H, Paulsson M, Hartmann U, Maurer P. Molecular cloning of testican-2: defining a novel calcium-binding proteoglycan family expressed in brain. *J Neurochem*. 1999 Jul;73(1):12-20.
- Vanti WB, Nguyen T, Cheng R, Lynch KR, George SR, O'Dowd BF. Novel human G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 23;305(1):67-71.
- Vicente J. Mecanismos neuronales de adaptación a la luz y oscuridad. Estudio comparativo en ratones controles y modelos de degeneración retiniana. Tesis Doctoral. 2009 Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares.
- Vugler AA, Semo M, Joseph A, Jeffery G. Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis Neurosci*. 2008 Mar-Apr;25(2):125-38.
- Wang JS, Kefalov VJ. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res*. 2011 Mar;30(2):115-28. Epub 2010 Nov 25.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*. 1997 Aug 7;388(6642):593-8.
- Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, Gapter L, Magnuson NS. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci*. 2001 Dec;2(3):167-79.
- Wässle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev*. 1991 Apr;71(2):447-80.
- White DR, Ganesh A, Nishimura D, Rattenberry E, Ahmed S, Smith UM, Pasha S, Raeburn S, Trembath RC, Rajab A, Macdonald F, Banin E, Stone EM, Johnson CA, Sheffield VC, Maher ER. Autozygosity mapping of Bardet-Biedl syndrome to 12q21.2 and confirmation of FLJ23560 as BBS10. *Eur J Hum Genet*. 2007 Feb;15(2):173-8.
- Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2007 May;26(3):263-301. Epub 2007 Jan 26.
- Yalcin B, Nicod J, Bhomra A, Davidson S, Cleak J, Farinelli L, Østerås M, Whitley A, Yuan W, Gan X, Goodson M, Klenerman P, Satpathy A, Mathis D, Benoist C, Adams DJ, Mott R, Flint J. Commercially available outbred mice for genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2010 Sep 2;6(9). pii: e1001085.

Bibliografía

Yokoyama T, Silversides DW, Waymire KG, Kwon BS, Takeuchi T, Overbeek PA. Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. *Nucleic Acids Res.* 1990 Dec 25;18(24):7293-8.

Zeiss CJ. Animals as models of age-related macular degeneration: an imperfect measure of the truth. *Vet Pathol.* 2010 May;47(3):396-413.

Zhang CL, Zou Y, Yu RT, Gage FH, Evans RM. Nuclear receptor TLX prevents retinal dystrophy and recruits the corepressor atrophin1. *Genes Dev.* 2006 May 15;20(10):1308-20.

Zhao Z, Chen Y, Wang J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, Cai J. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One.* 2011 Apr 29;6(4):e19456.

Zhou H, Gao J, Lu ZY, Lu L, Dai W, Xu M. Role of c-Fos/JunD in protecting stress-induced cell death. *Cell Prolif.* 2007 Jun;40(3):431-44.

Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, González-Neira A, López-Jiménez A, López-Moreno JA, Landel CP, Benítez J, Pazos F, Montoliu L. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.* 2011 Jun;20(3):481-9.